

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Herr Prof. Dr. Hans-Jürgen Möller

**Mechanismen von Exzitotoxizität und Neuroprotektion in
hippocampalen Zellen in einem *in vitro* Modell der
Schizophrenie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johanna Sophia Geiger

aus
München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dan Rujescu
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Peter Grafe Priv. Doz. Dr. Andreas Bender
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Just Genius
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.11.2009

*„Unser Wissen über die Schizophrenie gleicht einem Sandkorn
im Meer unserer Unwissenheit“*

sinngemäß zitiert nach Prof. Dr. Manfred Bleuler
auf einem Kongress in Travemünde
1975

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Schizophrenie allgemein.....	1
1.2	Biologische Genese vs. psychosoziale/psychodynamische Genese.....	2
1.3	Dopaminhypothese der Schizophrenie.....	4
1.4	Glutamathypothese der Schizophrenie.....	6
1.5	Biologie des glutamatergen Systems.....	8
1.5.1	Anatomie und Physiologie des Hippocampus.....	8
1.5.2	Funktion von Glutamat und NMDA-Rezeptoren im Hippocampus.....	10
1.6	Oxidativer Stress.....	13
1.6.1	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	13
1.6.2	Wasserstoffperoxid und seine Hydroxylradikale.....	15
1.6.3	Oxidativer Stress durch Defizit der antioxidativen Abwehr.....	16
1.6.4	Die Rolle von ROS bei psychiatrischen Erkrankungen.....	17
1.7	Entwicklung eines <i>in vitro</i> Modells der Schizophrenie basierend auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus durch MK-801.....	19
1.8	Kreatin.....	20
1.8.1	Kreatin als Nahrungsergänzung.....	20
1.8.2	Neuroprotektive Eigenschaften von Kreatin.....	21
1.8.3	Kreatin in einem <i>in vitro</i> Modell der Schizophrenie.....	23
2	Fragestellung.....	24
3	Material.....	25
3.1	Geräte.....	25
3.2	Einmal-Laborbedarf.....	26
3.3	Lösungen und Reagenzien.....	27

4	Methodik.....	28
4.1	Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen aus Rattenembryonen.....	28
4.1.1	Vorbereitungen für die Präparation.....	28
4.1.2	Isolation der Embryos.....	29
4.1.3	Zerkleinerung und Verdauung des Hirngewebes.....	32
4.1.4	Zählung und Kultivierung der Zellen.....	33
4.1.5	Neuronale Entwicklung primärer dissoziierter hippocampaler Zellen...	34
4.2	Enzymtests.....	35
4.2.1	LDH-Test zur Bestimmung der Zellvitalität.....	35
4.2.2	Messung der extrazellulären Glutamatkonzentration im Zellkulturüberstand.....	36
4.3	Fluoreszenztests.....	38
4.3.1	Quantitativer Nachweis von Superoxidanionen.....	38
4.3.2	Intrazelluläre ATP-Messung.....	40
4.3.3	Intrazelluläre Kalziummessung.....	41
4.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	42
5	Ergebnisse.....	43
5.1	Glutamaterge Dysbalance und oxidativer Stress in einem <i>in vitro</i> Modell der Schizophrenie basierend auf der Applikation von MK-801.....	43
5.1.1	Anstieg des intrazellulären Kalziums sowie der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies nach Triggerung durch Glutamat.....	43
5.1.2	Sekundärer Anstieg von Glutamat durch vermehrten oxidativen Stress oder MK-801-Gabe.....	46
5.1.3	Effekte des Kalziumchelators BAPTA/AM auf H ₂ O ₂ induzierten oxidativen Stress und auf den Glutamatefflux.....	48
5.1.4	Spontane und glutamatinduzierte ROS-Produktion unter der Behandlung von MK-801 und Haloperidol.....	50
5.1.5	Effekte von Haloperidol auf die zytotoxische Wirkung von MK-801.....	52
5.1.6	Wirkung von Haloperidol auf den Glutamatspiegel unter der Behandlung mit MK-801.....	55

5.2	Neuroprotektive Eigenschaften von Kreatin in einem <i>in vitro</i> Modell der Neurodegeneration.....	57
5.2.1	Kein Anhalt für Neurotoxizität von Kreatin nach Inkubation über einen längeren Zeitraum.....	57
5.2.2	Kein Anhalt für antioxidative Eigenschaften von Kreatin im zellfreien Medium.....	58
5.2.3	Neuroprotektive Wirkung von Kreatin bei glutamatinduzierter Neurotoxizität in hippocampalen Neuronen.....	59
5.2.4	Wirkung von Kreatin auf den Energiegehalt von hippocampalen Nervenzellen unter glutamatinduzierter Neurotoxizität.....	61
5.2.5	Wirkung von Kreatin auf den Energiestoffwechsel von hippocampalen Zellen bei experimentell herbeigeführtem oxidativen Stress durch H ₂ O ₂	62
5.2.6	Fehlender direkter neuroprotektiver Effekt durch Kreatin nach Induktion von oxidativem Stress durch H ₂ O ₂	64
5.2.7	Wirkung von Kreatin auf den Glutamatefflux hippocampaler Zellen bei experimentell herbeigeführtem oxidativen Stress durch H ₂ O ₂	65
5.2.8	Abschwächung des intrazellulären Kalziumanstiegs nach NMDA-Rezeptor-Stimulierung durch Kreatin.....	66
6	Diskussion.....	68
6.1	Validität der Methodik - Beurteilung von <i>in vitro</i> Experimenten.....	68
6.2	Glutamaterge Dysbalance und oxidativer Stress in einem <i>in vitro</i> Modell der Schizophrenie basierend auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801.....	69
6.2.1	<i>In vitro</i> -Induktion von oxidativem Stress durch Glutamat.....	70
6.2.2	Wirkung von MK-801 auf den Glutamatspiegel: <i>In vitro</i> im Vergleich zu <i>in vivo</i> Untersuchungen.....	73
6.2.3	Positiver Feedback-Kreislauf zwischen Glutamat und ROS unter MK-801.....	76
6.2.4	Wirkung von Haloperidol.....	78
6.3	Kreatin als Neuroprotektivum in einem <i>in vitro</i> Modell der Neurodegeneration.....	80
6.3.1	Kreatin als wichtiger Energielieferant des ZNS.....	81
6.3.2	Abnahme der glutamatinduzierten Neurotoxizität durch Anhebung des Energieniveaus durch Kreatin.....	82

6.3.3	Fehlender direkter neuroprotektiver Effekt durch Kreatin nach Induktion von oxidativem Stress durch H ₂ O ₂	84
6.3.4	Abschwächung des intrazellulären Kalziumanstiegs durch Kreatin nach NMDA-Rezeptor-Stimulierung.....	86
6.3.5	Kreatinvermittelte Abschwächung des sekundären Glutamat-exszesses bei oxidativem Stress.....	87
6.3.6	Kreatin als Supplementierungstherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	89
7	Zusammenfassung.....	90
8	Literaturverzeichnis.....	91
9	Danksagung.....	100
10	Lebenslauf.....	101

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat
AU	arbitrary units
BAPTA/AM	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure Acetoxymethylester
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CA1-CA4	Cornu ammonis, Region 1-4
CAT	Katalase
CK	Kreatinkinase
D ₁	Dopamin-1
D ₂	Dopamin-2
DIV	days in vitro
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-IV	Statistical Manual of Mental Disorders, 4 th edition
ED	embryonic day
EEG	Elektroencephalographie
GABA	γ -aminobutyric-acid
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD-10	International Classification of Diseases
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
NeuN	Anti-neuronal nuclei
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂ ⁻	Sauerstoffradikal
PBS	phosphatgepufferte Normalsalzlösung
PCP	Phencyclidin
PCr	Phosphokreatin
PUFAs	poly-unsaturated fatty acids

Rlu	relative light units
ROS	reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
TD	Tardive Dyskinesie
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie allgemein

Die Schizophrenie zählt zu den endogenen Psychosen und ist eine sehr heterogene Erkrankung, sowohl hinsichtlich des Symptomspektrums als auch neuropathologisch. Etwa 1% der Weltbevölkerung erkrankt mindestens einmal im Leben an Schizophrenie, wobei die Krankheit sich am häufigsten erstmals zwischen der Pubertät und dem 35. Lebensjahr manifestiert. Mit ihren volkswirtschaftlichen Kosten von etwa 3,5 bis 4 Mrd. Euro pro Jahr deutschlandweit ist die Schizophrenie unter gesundheitsökonomischen Aspekten durchaus mit somatischen „Volkskrankheiten“ wie etwa dem Diabetes mellitus vergleichbar [<http://www.kompetenznetz-schizophrenie.de/rdkns/22.htm>].

Bereits im Jahre 1886 fasste Emil Kraepelin den Symptomkomplex Hebephrenie, Paranoia und Katatonie unter dem Begriff „dementia praecox“ (vorzeitige Verblödung) zusammen, die die krankheitsbedingte Einbuße von Intellekt und Persönlichkeit und den damit verbundenen, meist ungünstigen Verlauf der Krankheit verdeutlichen sollte (65). 1911 schlug Eugen Bleuler vor, Kraepelins Begriff der „dementia praecox“ durch



Abb. 1: Emil Kraepelin (1856-1926)
Eugen Bleuler (1857-1939)

die noch heute gebräuchliche Krankheitsbezeichnung „Schizophrenie“ zu ersetzen. Diese Begriffsbildung sollte verdeutlichen, dass diese Krankheit zu einer „Spaltung der psychischen Funktionen“ führt [altgriechisch σχιζειν „abspalten“ und φρήν „Zwerchfell, Seele“]. Bleuler prägte auch die Unterscheidung zwischen den Grundsymptomen, zu denen Assoziationsstörungen, Affektstörungen, Autismus und Ambivalenz zählen, und den akzessorischen Symptomen, die sich aus Wahn, Halluzinationen und Katatonie zusammensetzen (101). Das von Kraepelin und Bleuler eingeführte Krankheitskonzept der Schizophrenie bildet auch heute noch die Grundlage der in den modernen Diagnosesystemen ICD-10 und DSM-IV angegebenen Kriterien einer schizophrenen Erkrankung, wobei man seit den 70er Jahren von Positiv- und Negativ-Symptomen spricht.

Die große Spannbreite der Symptome, ihr fluktuierender Verlauf und die individuell unterschiedlichen Symptomausprägungen lassen die Möglichkeit einer einzelnen

Krankheitsursache als unwahrscheinlich erscheinen und deuten auf komplexe Dysfunktionen unterschiedlicher zerebraler Strukturen und Prozesse hin, auf die in dieser Arbeit genauer eingegangen werden soll.

1.2 Biologische vs. psychosoziale/psychodynamische Genese der Schizophrenie

Eine eindeutige Ursache der Schizophrenie im Sinne eines singulären ätiologischen Faktors konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Vielmehr favorisiert die aktuelle Schizophrenieforschung ein Stress-Vulnerabilitäts-Modell und damit einen Ansatz, der die verschiedenen Ebenen der Pathogenese beschreibt und biologische, genetische und psychosoziale Faktoren zu integrieren versucht.

Aufgrund von Zwillings-, Adoptions- und Familienuntersuchungen kann man von einer hohen genetischen Beteiligung ausgehen. Es konnte gezeigt werden, dass das Erkrankungsrisiko für Schizophrenie in betroffenen Familien deutlich höher ist als in der Durchschnittsbevölkerung und dass es mit steigendem Verwandtschaftsgrad zu einem Erkrankten zunimmt (62). Bei Verwandten ersten Grades ist das Risiko zehnfach erhöht und liegt bei einer Lebenszeitprävalenz von etwa 10%, bei Angehörigen zweiten Grades bei etwa 5%. Sind beide Elternteile erkrankt, steigt das Risiko für die Kinder auf rund 40% an. In Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass das Erkrankungsrisiko bei eineiigen Zwillingen wesentlich höher ist (46%) als bei zweieiigen Zwillingen oder unter Geschwistern, die keine Zwillinge sind (beide 14%) (102). Die fehlende 100%-Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen weist darauf hin, dass für die Übersetzung des Genotyps in den Phänotyp weitere Faktoren, etwa somatischer, psychischer und sozialer Art, eine Rolle spielen.

Die genetische Komponente scheint aber trotzdem, weit mehr als der soziokulturelle Kontext, eine sehr entscheidende Rolle zu spielen. Ein formaler Erbgang ist unbekannt. Es wurde angenommen, dass ein dominantes Gen mit unvollständiger Penetranz weitervererbt wird, welches die Diskordanz bei eineiigen Zwillingen erklären könnte. Ein spezifisches Gen konnte dabei nicht identifiziert werden (83). Zwar wurden schon wiederholt verschiedene Genorte mit der Entstehung einer Schizophrenie in kausalen Zusammenhang gebracht, diese Befunde konnten jedoch in den meisten Fällen nicht repliziert werden. Formalgenetisch geht man von einem polygenen Erbgang aus, wobei man die Schizophrenie dabei zu den genetisch komplexen Erkrankungen zählen kann (51).

1.3 Dopaminhypothese der Schizophrenie

So unterschiedlich und variabel ihr Erscheinungsbild, so ist auch die Pathogenese der Schizophrenie ein multifaktorielles, komplexes Geschehen, weshalb einige Theorien mit verschiedenen Ansatzpunkten unterbreitet wurden:

So wurde ein Ungleichgewicht in unterschiedlichen Neurotransmittersystemen, vor allem dem dopaminergen und seit ein paar Jahren auch dem glutamatergen System postuliert. Auch Veränderungen in anderen Systemen werden zunehmend diskutiert, wie etwa dem GABAergen, dem serotonergen und cholinergen System, letztlich auch Interaktionen der genannten Systeme untereinander.

Vor etwa 30 Jahren stellte A. Carlsson die Dopaminhypothese der Schizophrenie auf (21). Dabei ging er von einer prä- oder postsynaptischen Regulationsstörung des Dopaminstoffwechsels aus mit einer dopaminergen Hyperaktivität in mesolimbischen Hirnregionen, die für die Positivsymptome verantwortlich sein könnten (90). Die damit einhergehende dopaminerge Hypoaktivität im Frontalhirn dürfte die Negativsymptome erklären (56). Diese Hypothese basiert vor allem auf zwei grundlegenden Feststellungen: Zunächst wurde beobachtet, dass der Missbrauch oder klinische Einsatz von Stimulanzien, wie etwa Amphetaminen und Kokain, die die zentrale dopaminerge Neurotransmission steigern, eine Psychose auslösen kann, die den Positivsymptomen der Schizophrenie gleicht (16). Des Weiteren weisen antidopaminerg wirkende Medikamente, insbesondere solche, die den Dopamin (D_2)-Rezeptor blockieren, wie z.B. Haloperidol und Chlorpromazin, eine stark antipsychotische Wirkung auf. Ihre Affinität zu den D_2 -Rezeptoren korreliert dabei hochsignifikant mit ihrer Wirkstärke. Da die D_2 -Rezeptoren vorwiegend in subkortikalen Regionen wie dem Striatum und dem Nucleus accumbens lokalisiert sind, betrifft die klassische Dopaminhypothese vorwiegend subkortikale Hirnregionen. In funktionellen Bildgebungsverfahren konnten indes auch Veränderungen im präfrontalen Kortex, in dem D_1 -Rezeptoren vorherrschen, festgestellt werden. Ein Dopamindefizit oder eine zu geringe Aktivierung von D_1 -Rezeptoren in diesen Regionen könnten an Negativsymptomen und kognitiven Beeinträchtigungen beteiligt sein.

Das gesamte Spektrum der Symptomatik kann durch dieses Modell jedoch nur lückenhaft erklärt werden: Einschränkungen erfährt die Dopaminhypothese vor allem durch die Tatsache, dass schizophrene Negativsymptome kaum durch Amphetamine induziert werden können und auch weniger gut auf die typischen Neuroleptika

ansprechen. Außerdem binden diese Neuroleptika nicht nur an dopaminerge, sondern, wenn auch mit deutlich niedrigerer Affinität, auch an serotonerge, histaminerge, cholinerge und vor allem an glutamaterge Rezeptoren. Die Wirklatenz stellt ein weiteres Problem dieser Hypothese dar. Wäre die antipsychotische Wirkung die direkte Folge der Wirkung der Neuroleptika an D₂-Rezeptoren, wäre es zu erwarten, dass es zu einem Verschwinden der Symptome innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden kommt (46). Die klinische Erfahrung lehrt, dass dies nur selten der Fall ist.

1.4 Glutamathypothese der Schizophrenie

Ausgehend von der Beobachtung der psychotomimetischen Wirkung von Glutamaterezeptorantagonisten und einer Vielzahl von Analogien zwischen neurobiologischen Befunden bei Schizophreniepatienten und pharmakologischen Schizophreniemodellen wurde in zunehmendem Maße die Glutamathypothese der Schizophrenie etabliert und neben der Dopaminhypothese bzw. in Kombination mit ihr diskutiert (56).

Die ersten Ansätze, sich eines NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Antagonisten zu bedienen, um modellhaft Teilaspekte der Schizophrenie im Sinne eines partiellen pharmakologischen Isomorphismus nachzuempfinden, sind das Resultat sorgfältiger klinischer Beobachtungen, die ihren Ausgang in den späten 50er Jahren nahmen: In dieser Zeit wurde die Substanz Phencyclidin (PCP) als Narkotikum entwickelt. In der klinischen Erprobungsphase war festzustellen, dass diese zunächst vielversprechende Substanz gehäuft zu einem katatonieähnlichen Zustandsbild führte, das durch die Dissoziation des Ich-Erlebens von der Umgebung bei weitgehend erhaltenem Bewusstsein gekennzeichnet war. In diesem Zusammenhang wurde die Bezeichnung „dissoziative Anästhetika“ für PCP und seine Derivate, wie z.B. Ketamin, das analoge Veränderungen hervorrief, eingeführt (56).

Diese Substanzgruppe erlangte im Bereich der biologisch-psychiatrischen Grundlagenforschung große Aufmerksamkeit nachdem bekannt wurde, dass die akute Gabe einer subanästhetischen PCP-Dosis bei gesunden Probanden zu psychopathologischen Veränderungen mit beeindruckender Ähnlichkeit mit bestimmten Primärsymptomen des schizophrenen Formenkreises führte (55). Bei der Anwendung von PCP in narkotisch wirksamer Dosierung zeigte sich, dass bis zu 50% der erwachsenen Patienten schwere Komplikationen in der postoperativen Aufwachphase mit Agitiertheit und Halluzinationen erlitten. Diese Reaktion bestand auch nach Abklingen der Narkose in einem hohen Prozentsatz der (in der Anamnese psychopathologisch meist völlig unauffälligen) Fälle in Form eines psychotischen Syndroms mit Exzitation, Verhaltensauffälligkeiten und Halluzinationen für bis zu zehn Tage fort. Den dissoziativen Anästhetika mit Angriffspunkt am Ionenkanal des NMDA-Rezeptors ist neben PCP und Ketamin auch MK-801 zuzurechnen. Diese liquorgängige Substanz wurde initial als potentes Antikonvulsivum mit anxiolytischen und zentral-sympathomimetischen Eigenschaften beschrieben. Ungeachtet eines möglichen neuroprotektiven Potentials bei exzitotoxischen Ereignissen, namentlich

zerebralen Krampfanfällen, musste vom klinischen Routineeinsatz Abstand genommen werden, da sein neurochemisches Profil in Analogie zu den Beobachtungen bei PCP und Ketamin eine potentiell psychotomimetische Wirkung befürchten ließ, was auch Versuche im Tiermodell nahelegten.

1.5 Biologie des glutamatergen Systems

1.5.1 Anatomie und Physiologie des Hippocampus

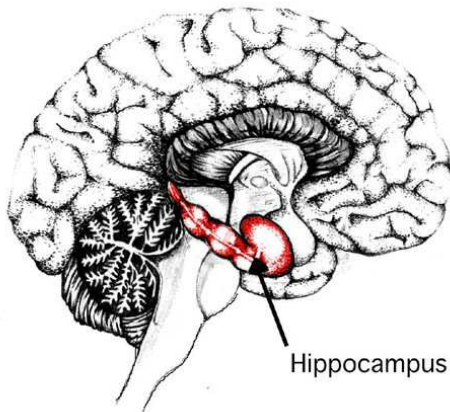


Abb. 2: Lage des Hippocampus im medialen Teil des Telencephalons

Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns und liegt im medialen Teil des Telencephalon, paarig im Bereich der Temporallappen (Abb. 2). Er bildet die zentrale Schaltstelle des limbischen Systems und erhält Informationen von verschiedenen sensorischen Systemen, um diese nach weiterer Prozessierung zum Kortex zurück zu projizieren. Der Hippocampus ist entscheidend an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt, also an der Überführung von Gedächtnisinhalten vom

Kurz- ins Langzeitgedächtnis. Schizophrene Patienten weisen nachweislich Defizite im Lang- und Kurzzeitgedächtnis auf. Dafür werden vor allem Schwierigkeiten bei Enkodierungsprozessen verantwortlich gemacht, also bei der Einspeicherung neuer Informationen, wobei das Abrufen bereits erworbener Gedächtnisinhalte weniger beeinträchtigt zu sein scheint (23). Mittels bildgebender Verfahren wurde bei Schizophreniepatienten eine geringere Rekrutierung des Hippocampus während des bewussten Erinnerns festgestellt (109), sowie Volumenreduktionen im Bereich der Frontallappen und medialen Temporallappen unter Beteiligung hippocampaler Strukturen (38,70). Im Rahmen von *post mortem* Studien wurde eine geringere Expression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors nachgewiesen (43,72). Da es nahe liegt, dass es sich bei den besagten Veränderungen um das morphologische Korrelat der bei Schizophrenie festgestellten kognitiven Defizite handeln könnte, soll nun weiter auf Anatomie und Funktion des Hippocampus eingegangen werden.

Da der Hippocampus auch Formationen umfasst, die u.a. im präfrontalen Kortex lokalisiert sind, spricht man von der Hippocampusformation. Im Einzelnen besteht diese aus dem Gyrus dentatus, dem Subiculum und dem Cornu ammonis, das man in vier Felder unterteilen kann (CA1-CA4). Diese Strukturen stehen vor allem über erregende Neuronen im Austausch (Abb. 3). Der entorhinale Kortex stellt ein besonders wichtiges Element im parahippocampalen Kortex dar, da dieser über den

sogenannten Tractus perforans Informationen auf die glutamatergen Körnerzellen des Gyrus dentatus projiziert. Von dort aus ziehen die Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern zu den Pyramidenzellen der CA3-Region und von diesen wiederum zur CA1-Region (sog. Schaffer-Kollateralen). Die CA1-Region schließt den „Schaltkreis“, indem sie sowohl zum Subiculum als auch zurück zum entorhinalen Kortex projiziert (4).

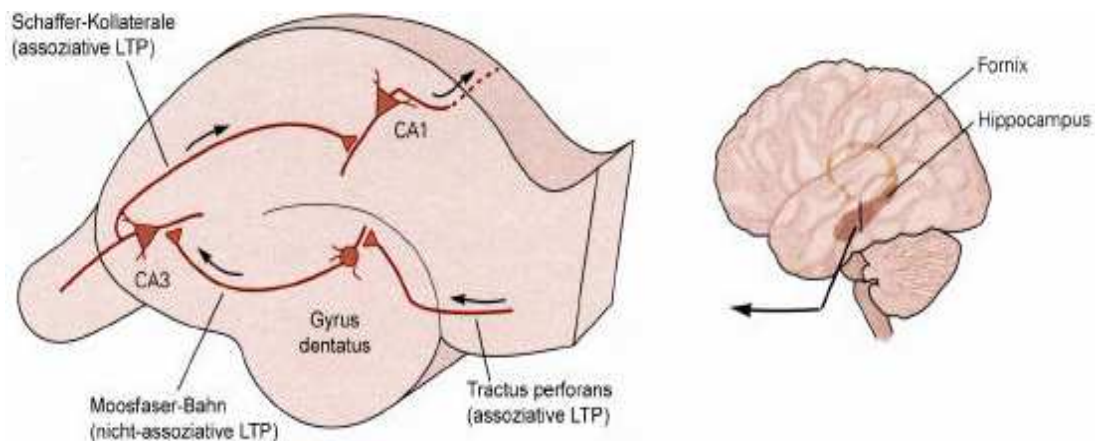


Abb. 3: Übersicht der funktionellen Anatomie der Hippocampusformation

Die Hippocampusformation besteht aus dem Gyrus dentatus, dem Subiculum und dem Cornu ammonis, das in vier Felder unterteilt wird (CA1-CA4). Über den Tractus perforans im entorhinalen Kortex werden Informationen über den Gyrus dentatus auf die Pyramidenzellen der CA3-Region und von diesen wiederum zur CA1-Region (sog. Schaffer-Kollateralen) projiziert, um die Informationen dann zum Subiculum als auch zurück zum entorhinalen Kortex zu leiten. [<http://www.anatom.uni-tuebingen.de/docs/NeuroSinneSS2005/06-Telencephalon-Allocortex.pdf>]

Durch ein selektives Ausschalten von NMDA-Rezeptoren in der CA3-Region wird das Abrufen von Gedächtnisinhalten bei partiellem sensorischen Input (Autoassoziation), nicht aber die Gedächtnisbildung beeinträchtigt. Über den Gyrus dentatus erfolgt der stärkste Informationsinput vom Kortex zum Hippocampus. Für die Gedächtnisbildung bei sensorischem Input jedoch scheint eine andere funktionelle Schleife verantwortlich zu sein, die direkt über das Subiculum auf die CA1-Region projiziert, wo sie in den meisten Pyramidenzellen hemmende Potentiale erzeugt. Bei einem selektiven *knock-out* von NMDA-Rezeptoren der CA1-Region kam es zur Beeinträchtigung der Langzeitpotentiale der Pyramidenzellen. Auf die Rolle von NMDA-Rezeptoren bei der Gedächtniskonsolidierung wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.5.2 Funktion von Glutamat und NMDA-Rezeptoren im Hippocampus

Unter den Transmittersystemen des Zentralnervensystems (ZNS) nimmt das glutamaterge System eine Sonderrolle ein. Glutamat ist nicht nur Substrat der schnellen synaptischen Übertragung, sondern auch in Prozesse wie Synaptogenese, Gedächtnisbildung und möglicherweise auch in die Kontrolle von neuronaler Proliferation und Apoptose im Gehirn involviert. Innerhalb der hippocampalen Formation und im Neokortex stellt es den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter dar, der über Mechanismen wie „long-term potentiation“ (LTP) und „long-term depression“ (LTD) die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten ermöglicht.

Glutamat wird bei neuronaler Erregung aus hippocampalen und kortikalen Pyramidenzellen und Körnerzellen des Gyrus dentatus in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet postsynaptisch an ionotrope sowie metabotrope Glutamatrezeptoren. Letztere sind größtenteils mit G-Protein gesteuerten Signalkaskaden assoziiert.

Unter den ionotropen Glutamatrezeptoren unterscheidet man NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren, die alle nach der Wirksamkeit ihrer spezifischen Agonisten benannt sind und eine tetramere Struktur besitzen (67). Wenn Glutamat bindet, strömen Na^+ und K^+ -Ionen durch die geöffneten Ionenkanäle ein und depolarisieren die neuronale Membran. Die Kanäle sind auch in verschiedenem Maße für Kalzium (Ca^{2+}) permeabel, das für die Erzeugung eines LTPs notwendig ist. Kalzium stimuliert die intraneuronale Signalübertragungskaskade. Dabei nimmt die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Rezeptoren, Ionenkanälen, Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren. Unter der Kontrolle der letztgenannten sind die neu exprimierten Gene und Proteine an der Konstruktion neuer Synapsen und an der Stabilisierung synaptischer Verbindungen beteiligt und somit neben vielen anderen Aufgaben für die Vermittlung neuronaler Plastizität verantwortlich.

Am besten untersucht ist die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren, die der spannungsabhängigen Blockade durch Magnesium (Mg^{2+})-Ionen unterliegen. NMDA-Rezeptoren sind in Abgrenzung zu AMPA- und Kainatrezeptoren zusätzlich durch ihre hohe Permeabilität für Ca^{2+} und langsame Öffnungskinetik charakterisiert. Die Blockade durch Magnesium-Ionen verhindert eine Öffnung der Ionenkanäle direkt nach Bindung eines Liganden. Zur Lösung dieses Magnesiumblocks bedarf es einer Synchronisierung der prä- und postsynaptischen Aktivität: Bei der Bindung von Liganden an den Rezeptor und einer gleichzeitigen postsynaptischen Depolarisation,

die zum Beispiel durch mit dem NMDA-Rezeptor kolokalisierte AMPA-Rezeptoren gewährleistet wird, verlässt das Magnesium-Ion seine Bindungsstelle und ermöglicht somit die Öffnung des Ionenkanals im NMDA-Rezeptor (67). Bei Synapsen ohne AMPA-Rezeptoren kommt es viel seltener zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran und damit zu einer Ionenpermeabilität der NMDA-Rezeptoren. Es wurde festgestellt, dass die über den NMDA-Signalübertragungsweg aktivierten CaM Kinasen II verantwortlich für den Einbau von AMPA-Rezeptoren in die präsynaptische Membran sind und somit eine höhere Aktivität von NMDA-Rezeptoren gewährleistet ist (110).

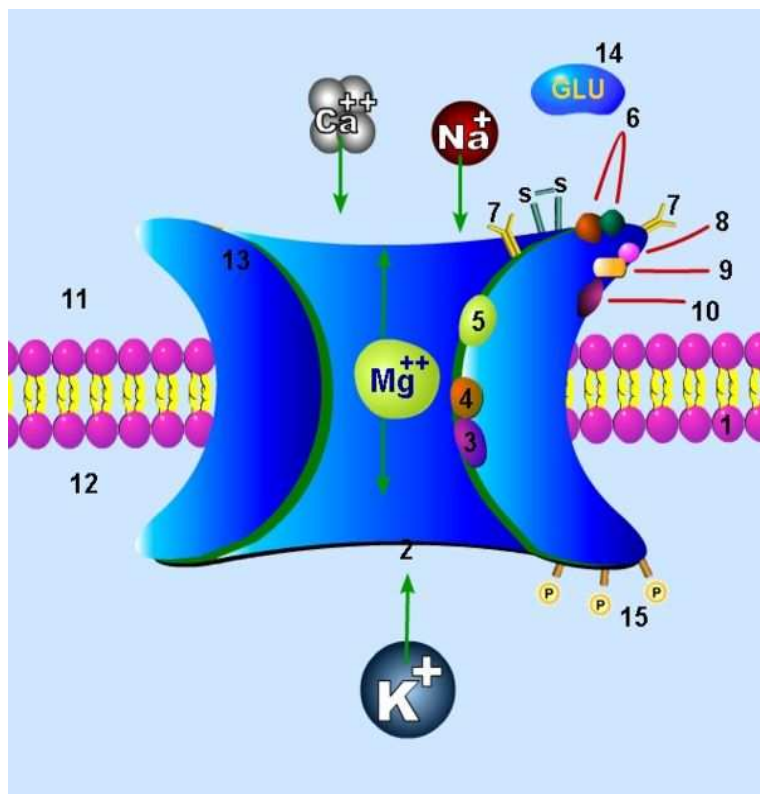


Abb. 4: Der NMDA-Rezeptor und seine Bindungsstellen für Agonisten, Antagonisten und Regulatoren

Sein komplex gebauter Ionenkanal ist charakterisiert durch spannungsabhängige Magnesiumionen-Blockade, hohe Kalziumionen-Permeabilität und langsame Öffnungskinetik.

1: Zellmembran, 2: Ionenkanal, 3: Mg^{2+} -Bindungsstelle, 4: MK-801- und PCP-Bindungsstelle, 5: Zn^{2+} -Bindungsstelle, 6: Glutamat-, NMDA-Agonisten-Bindungsstelle, 7: Glykosilierungsstelle, 8: H^+ -Bindungsstelle, 9: Glyzin-Bindungsstelle, 10: Polyamin-Bindungsstelle, 11: extrazellulär, 12: intrazellulär, 13: NMDA-Rezeptor, 14: Glutamat, 15: Phosphorylierungsstelle

[Schematische Darstellung: homepage.univie.ac.at/michael.berger/lernen-molek.ppt]

An der Beeinträchtigung kognitiver Funktionen von Schizophreniepatienten scheint eine Dysbalance der NMDA-Rezeptorfunktion beteiligt zu sein. Lewis und Liebermann wiesen im Jahre 2000 in *post mortem* Material schizophrener Patienten fehlerhafte Verbindungen und eine Verringerung der Synapsendichte als Folge einer abnormen neuronalen Entwicklung nach. Des Weiteren wurde eine geringere Dichte von dendritischen „spines“ (44,45) und von Neuropil (95) bei schizophrenen Patienten gefunden. Es gibt viele Hinweise dafür, dass frühe Fehlfunktionen im glutamatergen System zu fehlerhaften Verbindungen und damit zu Anomalien bei der Signalübertragung führen können. Eine Hypoaktivität in der glutamatergen Signaltransduktion kann eine Ursache für die veränderten Verbindungen und Rezeptordichten bei der Schizophrenie sein und findet damit Eingang in die Glutamathypothese der Schizophrenie.

1.6 Oxidativer Stress

Bereits am Ende des 19. Jahrhunderts wurde von Paul Bert die toxische Wirkung von Sauerstoff auf neuronale Gewebe beschrieben, indem er das veränderte Verhalten von Tieren unter hyperoxischen Bedingungen untersuchte. Seit dem 20. Jahrhundert werden oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) zunehmend in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen gesehen, darunter Schlaganfälle, amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson sowie Morbus Alzheimer (27). Es gibt aber auch immer mehr Hinweise dafür, dass ROS als Hauptmediatoren von Zytotoxizität in die Pathophysiologie der Schizophrenie involviert sein könnten (76).

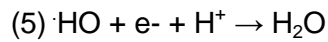
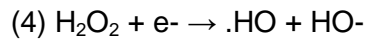
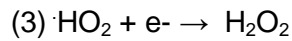
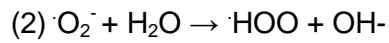
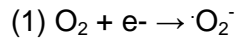
1.6.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies

Oxidativer Stress entsteht, wenn die Produktion freier Sauerstoffradikale die Kapazität der antioxidativen Abwehr überschreitet. Zum einen kann dieses Ungleichgewicht durch eine Akkumulation von ROS, entweder durch äußere Einflüsse (z.B. durch Exposition mit H_2O_2 oder Glutamat) sowie intrazelluläre Störungen (z.B. Gendefekte) hervorgerufen werden, oder zum anderen durch eine verminderte ROS-Abbaurrate aufgrund eines reduzierten Antioxidationsmechanismus.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören sowohl freie Radikale wie das Superoxidradikal ($\cdot\text{O}_2^-$), das Hydroxylradikal ($\cdot\text{HO}$) und das Hydroperoxylradikal ($\cdot\text{HOO}$), als auch Nicht-Radikale wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), singulärer Sauerstoff (O_2) oder Hypochlorid (OCl^-). Die nicht-radikalischen Verbindungen werden häufig in Reaktionen zu freien Radikalen umgewandelt. Definitionsgemäß sind freie Radikale alle Atome oder Moleküle, die über ein oder mehrere ungepaarte Elektronen verfügen (50). Sie sind sehr reaktionsfreudig und besitzen die Fähigkeit, zahlreichen organischen und anorganischen Molekülen und Atomen Elektronen zu entziehen. Die entstehenden Produkte sind häufig ebenso Radikale, was zu Kettenreaktionen führen kann.

Die Bildung von ROS erfolgt unter physiologischen Bedingungen während des aeroben Stoffwechsels, wobei Sauerstoff den häufigsten Reaktionspartner für Radikalreaktionen darstellt (89). Sauerstoff besitzt zwei ungepaarte Elektronen und

wird in der Atmung unter der Bildung von radikalischen Zwischenprodukten zu Wasser reduziert:

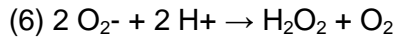


Der größte Anteil der ROS entsteht im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien (50). Dabei spielen Elektronenkurzschlüsse, sog. „shunts“, an den Komplexen II und III der Atmungskette die wichtigste Rolle. So werden ca. 1-3% des verbrauchten Sauerstoffs lediglich univalent reduziert und damit zu ROS umgewandelt (19).

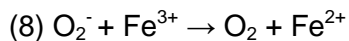
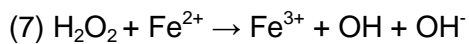
Auch extramitochondrial werden freie Sauerstoffradikale stetig in niedrigen Konzentrationen generiert, etwa bei der Aktivität verschiedener Oxidasen, Peroxidasen und Cytochrom P450, bei der Autooxidation von Indolaminen, Katecholaminen oder Übergangsmetallen, sowie bei photochemischen Reaktionen oder durch die Wirkung ionisierender Strahlung (49).

1.6.2 Wasserstoffperoxid und seine Hydroxylradikale

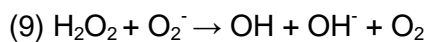
Die Generierung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erfolgt sowohl enzymatisch, z.B. durch die Superoxiddismutase (SOD), als auch über einen nicht-enzymatischen Weg.



H_2O_2 ist im chemischen Sinne kein Radikal, wird aber wegen seiner Fähigkeit, hochaktive Hydroxylradikale zu bilden, zur Familie der ROS gezählt. Während es in physiologischen Konzentrationen die Funktion eines Signalmoleküls wahrnehmen kann, ist es - in exzessiven Konzentrationen - ein potentes Neurotoxin, das an oxidativem Stress beteiligt sein kann. H_2O_2 selbst ist langlebig und nur in geringem Maße reaktiv; es besitzt aber eine hohe Diffusionsreichweite. Durch diese Eigenschaften wird es zu einem Vorläufertoxin, das Zytotoxizität von einer auf die nächste Zelle zu übertragen vermag. Über Hydroxylradikale wird der toxische Effekt von H_2O_2 vermittelt. Diese erweisen sich als äußerst reaktionsfreudig und können daher biologische Membranen nachhaltig schädigen. Sie entstehen mit Hilfe der katalytischen Wirkung von Metallen, wie z.B. zweiwertigem Eisen im Rahmen der sog. Fenton-Reaktion (97):



Das hochaggressive OH^- kann auch alternativ bei der sog. Haber-Weiss-Reaktion entstehen:

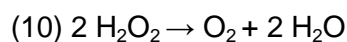


1.6.3 Oxidativer Stress durch Defizit der antioxidativen Abwehr

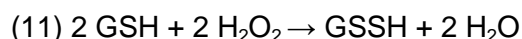
Während antioxidative Systeme mit den unter physiologischen Bedingungen anfallenden ROS mühelos fertigwerden, kann es bei Störungen der Redoxhomöostase, etwa infolge einer Schädigung der Mitochondrien oder einem Defizit im antioxidativen System zu einer Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit zu pathophysiologisch bedeutsamem oxidativen Stress kommen. Beim Auftreten von oxidativem Stress werden Kettenreaktionen initiiert, in denen ROS mit Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden, und Nukleinsäuren interagieren. Dies kann durch Translationsfehler, DNA-Strangbrüche, Lipid-Peroxidationen, die Membranpermeabilität und Proteinstruktur verändern und damit zelluläre Fehlfunktionen zur Folge haben, mitunter sogar Zelltod durch Apoptose oder Nekrose initiieren.

Im intakten Zellmetabolismus werden ROS normalerweise kurz nach ihrer Bildung, bevor sie Schaden anrichten können vom antioxidativen Abwehrsystem deaktiviert. Zu den wichtigsten antioxidativ wirkenden Enzymen des Körpers gehören die Superoxiddismutase (SOD), Glutathion Peroxidase (GPx) und Katalase (CAT)

H₂O₂ wird durch die Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt, wobei H₂O₂ reduziert und das Enzym selbst oxidiert wird:



Auch Glutathion erfüllt eine wichtige Aufgabe als Radikalfänger, indem es durch die Glutathionperoxidase die antioxidative Aktivität der Katalase unterstützt:



Eine ansteigende ROS-Produktion wird normalerweise durch die vermehrte Expression von antioxidativen Systemen beantwortet. Nicht unerwähnt bleiben darf, dass ROS in niedrigen, physiologischen Konzentrationen als Signalmoleküle mit einem weiten Funktionsfeld einschließlich der Regulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Ionentransport, Transkription und Neuromodulation zu agieren vermögen.

1.6.4 Die Rolle von ROS bei psychiatrischen Erkrankungen

Als Organ mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch und somit der physiologisch erhöhten Bildung von ROS ist das Gehirn besonders anfällig für oxidativen Stress. Es macht nur wenige Prozent des Körpergewichts aus, verbraucht aber etwa 20% des basalen Sauerstoffangebotes des gesamten Körpers. Die Neuronen benötigen O_2 besonders zur mitochondrialen Produktion von ATP, welches unter anderem erforderlich ist, um Ionengradienten über die Zellmembran aufrechtzuerhalten (Kalium intrazellulär hoch, Natrium niedrig, Kalzium sehr niedrig). Dabei wird molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die durch die antioxidative Abwehr eliminiert werden müssen.

Aber auch bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, zu denen nach unserer Vorstellung auch die Schizophrenie zählen könnte, wird oxidativer Stress als auslösender Faktor diskutiert. Einerseits scheint eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle zu spielen, andererseits auch eine geschädigte antioxidative Abwehr.

Zunächst wurden Sauerstoffradikale bei psychiatrischen Erkrankungen nur als ein Faktor bei der Entstehung von Medikamentennebenwirkungen diskutiert, wie zum Beispiel der Spätdyskinesie (TD) bei langjähriger Gabe von Haloperidol. Im Plasma von Patienten mit TD (85) und im Liquor von mit Neuroleptika behandelten Patienten (84) konnten als Indikator für oxidativen Stress erhöhte Spiegel an Thiobarbiturat reaktiven Substanzen und erniedrigte Plasmaspiegel von SOD, GPx und CAT gemessen werden (114). Doch auch bei unbehandelten Schizophrenen wurden in der ersten Episode ihrer Psychose erhöhte Plasmaspiegel an Lipid-Peroxidationsprodukten nachgewiesen (77). Dies kann zu einer Abnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Phospholipiden in der Plasmamembran führen, was auch in einigen Studien bestätigt wurde: Bei unbehandelten Schizophreniepatienten erwiesen sich die Spiegel an Phospholipiden in Erythrozytenmembranen (63) sowie an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) als erniedrigt (76). Auch der erhöhte Spiegel von Erythrozyten-SOD bei Schizophrenen, der in den meisten Studien nachgewiesen wurde, gibt einen Hinweis auf einen erhöhten oxidativen Tonus (88).

Pathologischen Auswirkungen von Sauerstoffradikalen kann man auf zwei Arten begegnen. Zunächst durch Inaktivierung von ROS durch Gabe von Antioxidantien und zweitens durch die Wiederherstellung der zerstörten Phospholipid-PUFA-Membran durch Gabe von essentiellen Fettsäuren. Vitamin E allein erzielte eine

Symptombesserung bei der TD (2,3,85), in besonderem Maße bei Patienten, die weniger als fünf Jahre an TD erkrankt waren. Dabei ist die prolongierte Applikation höchster Dosen erforderlich, um ausreichende Gewebsspiegel im ZNS zu erreichen. Durch eine Supplementierung von essentiellen Fettsäuren in einem Zeitrahmen von 16 Wochen kam es zu einer Verbesserung kognitiver Funktionen bei Schizophrenen (103).

1.7 Entwicklung eines *in vitro* Modells der Schizophrenie basierend auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801

Geeignete pharmakologische Schizophreniemodelle müssen das Nebeneinander von Positiv- und Negativsymptomatik berücksichtigen. Im Unterschied zu den meisten Psychosemodellen, die nur Positivsymptome zu induzieren vermögen, wird in einem auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus basierenden Modell neben Positivsymptomen, auch nahezu das gesamte Spektrum schizophrenietypischer Negativsymptome und kognitive Defizite bei Mensch und Tier nachempfunden. Aufgrund dieser Eigenschaften zählt dieses Modell zu den derzeit anerkanntesten Tiermodellen (35,57). Besonders Befunde nach wiederholter, niedrigdosierter Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten spiegeln die pathophysiologischen Veränderungen der Schizophrenie wieder. Bei Personen, die über einen längeren Zeitraum PCP eingenommen haben, traten kognitive Defizite, Verhaltensauffälligkeiten und Veränderungen im zerebralen Blutfluss auf, wie sie auch bei Schizophrenen vorkommen (57). Analoge Veränderungen wurden auch im Tiermodell durch die wiederholte Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten beobachtet. Sowohl Nager, die mit MK-801 behandelt wurden, als auch solche, die eine verminderte Expression von NMDA-Rezeptoren aufwiesen, zeigten Verhaltensanomalien, wie z.B. motorische Hyperaktivität, gehäufte Stereotypen und sozialen Rückzug, die an eine schizophrenietypische Symptomatik erinnern (37). Als PPI (sog. „prepulse inhibition“) wird die abgeschwächte Schreckreaktion auf einen plötzlichen und intensiven Stimulus, der auf einen schwächeren Stimulus ohne Schreckauslösung folgt, bezeichnet. Ein Defizit dieses Phänomens wird bei Schizophreniepatienten als Ausdruck der kognitiven Beeinträchtigung beobachtet und findet sich, analog zu Defiziten in Lern- und Gedächtnistests, reproduzierbar bei Ratten nach Behandlung mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten (34).

Um neurobiologische Veränderungen unter NMDA-Rezeptor-Antagonismus auf zellbiologischer Ebene genauer analysieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ergänzend zu dem Tiermodell ein *in-vitro* Modell der Schizophrenie basierend auf dem NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801 eingesetzt, anhand dessen neurobiologische Vorgänge auf zellulärer Ebene genauer untersucht werden konnten. Dabei wurde auch die Wirkung von Kreatin als potentiell neuroprotektives Pharmakon bei oxidativem Stress sowie seine direkte Wirkung auf den NMDA-Rezeptor-medierten Kalziumanstieg genauer untersucht.

1.8 Kreatin

Bei Kreatin [altgriechisch κρέας „Fleisch“] handelt es sich um die organische Säure N-Methylguanidylelessigsäure, die schon 1834 von dem Franzosen namens Chevreul als Bestandteil der Fleischbrühe erkannt und 1847 von Justus von Liebig als Komponente von Fleisch in einigen Säugetierarten nachgewiesen wurde. Kreatin wird zum

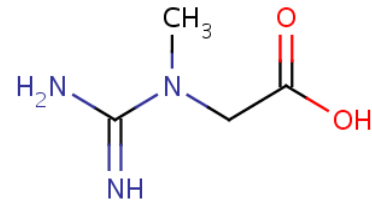


Abb. 5: Chemische Formel von Kreatin

einen Teil selbst im Körper hergestellt, zum anderen Teil wird es auch durch die Nahrung, vor allem durch Fleisch und Fisch, aufgenommen. Der tägliche Bedarf beträgt etwa 2 bis 4 Gramm. Der Kreatingehalt eines 70 kg schweren Körpers wird auf 100-120 g geschätzt, wobei es hauptsächlich im Skelett- und Herzmuskel und im Gehirn vorzufinden ist [www.cell.biol.ethz.ch/research/wallimann]. Unter dem Einfluss des Enzyms Kreatinkinase (CK) wird aus Kreatin und ATP das energiereiche Kreatinphosphat gebildet, das vor allem in den Muskeln und im Gehirn einen großen Beitrag zur Aufrechterhaltung des internen Zellmilieus durch die energetische Versorgung von Ionenpumpen (Ca^{2+} , Na^+/K^+ -Pumpen) leistet. Des Weiteren wurde die Funktion von Kreatin als Energiepuffer und als Transportform von Energie in der Zelle beschrieben (107).

1.8.1 Kreatin als Nahrungsergänzung

Die Bildung von Kreatin erfolgt vorrangig in der Leber, den Nieren und dem Pankreas (111), wohingegen die Aktivität der endogenen *de novo* Synthese im Gehirn relativ niedrig ist. Da auch unter normalen Bedingungen die zusätzlich über die Nahrung aufgenommene Menge an Kreatin 50% des gesamten Kreatingehalts des Organismus ausmacht, könnte eine entsprechend dosierte Kreatin-Diät eine effiziente Strategie darstellen, die Kreatinkonzentrationen im Gewebe zu erhöhen um damit eine Energiereserve aufzubauen. Da die Blut-Hirn-Schranke die Passage von Kreatin ermöglicht, müsste eine systemische Kreatingabe für die Unterstützung des zerebralen Energiestoffwechsels ausreichend sein (30). Letztlich erfolgt das Einschleusen von Kreatin in die neuronalen Zellen durch einen spezifischen transmembranären Natrium-Chlorid-abhängigen Transporter, der gegen einen Konzentrationsgradienten arbeitet (54).

1.8.2 Neuroprotektive Eigenschaften von Kreatin

Kreatin, Phosphokreatin, sowie das Enzym Kreatinkinase sind in den Nervenzellen des Gehirns in hohen Konzentration angereichert, besonders in Zellen, die für die Koordination und Bewegung (Purkinje-Zellen des Kleinhirns), aber auch für Lernprozesse und Gedächtnis (Pyramidenzellen des Hippocampus) zuständig sind (59). Daraus kann man schließen, dass Kreatin eine besonders wichtige Bedeutung im Energiehaushalt dieser Hirnfunktionen spielen könnte.

Bestätigt wird dies durch eine klinische Fallbeobachtung zweier Kinder, die durch erhebliche neurologische Störungen auffielen und bei denen stark erniedrigte Mengen an Kreatin im Gehirn, durch einen genetischen Defekt im Kreatin-Synthese-Weg (Guanidinoazetat-Amino-Transferase) verursacht, festgestellt wurden. Durch eine regelmäßige Kreatingabe über zwei Jahre konnten sowohl der Kreatingehalt im Gehirn normalisiert als auch die neurologische Symptomatik wesentlich verbessert werden (99,100).

Neuesten Befunden zur Folge scheint sich Kreatin positiv auf die Gehirnleistung auszuwirken und den Krankheitsverlauf von gewissen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, Chorea Huntington, Multiple Sklerose oder Parkinson positiv zu beeinflussen (78). Klivenyi et al. haben 1999 eine eindeutig neuroprotektive Wirkung von Kreatin im transgenen Tiermodell (SOD-Mutante) bei ALS nachgewiesen (64). Von derselben Arbeitsgruppe konnte eine ähnliche neuroprotektive Wirkung von Kreatin an einem Tiermodell für Morbus Parkinson demonstriert werden (78). Ebenso konnten in einem Tiermodell für Hirnischämie und Schlaganfall die sekundären Schäden um den effektiven Hirninfarkt herum (Penumbra) deutlich verringert werden (1,87). Im Rahmen der Prävention von Komplikationen nach Schädel-Hirn-Trauma hat sich die Gabe von Kreatin bewährt. Dabei wurden in einer Pilotstudie 39 Kindern und Jugendlichen mit traumatischen Hirnverletzungen während sechs Monaten 0.4 Gramm Kreatin/kg Körpergewicht/Tag verabreicht und festgestellt, dass die Kreatin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant bessere Wiederherstellung der kognitiven Fähigkeiten, der Persönlichkeits- und Verhaltensfaktoren, sowie der Mobilität und Selbständigkeit zeigte (92).

Die neuroprotektive Wirkung von Kreatin wird besonders in Bezug auf Schäden durch Sauerstoffmangel (53) oder durch Sauerstoffradikale (64) dokumentiert. Auf welchen Mechanismen das neuroprotektive Potential gründet, ist noch Gegenstand intensiver Forschung. Eine generelle Verbesserung des Energiestatus der mit Kreatin behandelten Zellen (106) und/oder die Schutzwirkung von Kreatin direkt auf die

Mitochondrien scheint dabei eine große Rolle zu spielen, wodurch Zellen und Gewebe vor Stressoren und vor Apoptose geschützt werden können (15,82). Auf Zellkulturebene konnte bereits gezeigt werden, dass Kreatin das Absterben von Neuronen verhindert, die entweder durch Glutamat überstimuliert oder mit dem Alzheimer Beta-Amyloid Protein versetzt wurden (17). Welchem Mechanismus der neuroprotektive Effekt von Kreatin zugrunde liegt ist noch nicht ausreichend erforscht und sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

1.8.3 Kreatin in einem *in vitro* Modell der Schizophrenie

Da die Schizophrenie einige Kerneigenschaften mit den oben erwähnten neurodegenerativen Erkrankungen teilt, könnte sich Kreatin als ein interessanter neuer Wirkstoff in der Psychopharmakologie erweisen, insbesondere in präventiver Hinsicht. Auf zellulärer Ebene geht man davon aus, dass ungünstige metabolische Bedingungen an der Pathogenese und Progression der Schizophrenie beteiligt sein könnten. Durch das Erstellen eines *in-vitro*-Modells der Neurodegeneration sollen neue Erkenntnisse über die pharmakologischen Eigenschaften von Kreatin gewonnen werden, wobei verschiedene Schädigungsparadigmen nachgeahmt wurden, vor allem solche, die bei einer Psychose eine Rolle spielen könnten.

Dieses *in vitro* Modell stellt dabei eine sinnvolle Ergänzung zu den *in vivo* Strategien dar, wie unsere Arbeitsgruppe es in bereits publizierten Untersuchungen anhand von biochemischen Analogien mit komplementären Tiermodellen, wie es bereits oben genauer erwähnt wurde, zeigen konnte (12). Für eine biochemische Analyse sind Zellkulturmodelle aufgrund ihrer reduzierten biologischen Komplexität besonders geeignet. Speziell im Falle des Kreatinmetabolismus würde es selbst nach intravenöser Gabe unmöglich sein, kontrollierte Bedingungen der Kreatinzufuhr in einer bestimmten Konzentration zu erstellen, da man von systemischen Kreatinquellen und von einer komplexen Pharmakokinetik in den unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers ausgehen muss. Chen et al. haben bereits 1995 gezeigt, dass die Expression von BB-CK und uMt-CK bei Nagern bereits ab ED 14, wenn nicht sogar vorher, einhergehend mit einer signifikanten CK-Aktivität stattfindet (24). Daher eignen sich kultivierte embryonale, kortikale und hippokampale Neuronen zur Messung des neuroprotektiven Potentials von Kreatin.

2 Fragestellung

Da auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus basierende Schizophreniemodelle neben Positivsymptomen auch nahezu das gesamte Spektrum schizophrenietypischer Negativsymptome und kognitive Defizite bei Mensch und Tier nachahmen können, zählen diese zu den derzeit anerkanntesten Tiermodellen der Schizophrenie (35,57). In Anlehnung an das Tiermodell unserer Arbeitsgruppe soll nun auch in einem *in vitro* Modell auf zellulärer Ebene genauer analysiert werden, in wieweit sich der NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801 auf den Glutamatmetabolismus und oxidativen Stress auswirkt. Ziel dabei ist es, einen besseren Einblick in die Pathogenese der Schizophrenie zu erhalten um dadurch protektive Strategien ableiten zu können.

Die Fragen lauten im Einzelnen:

1. Wie wirkt sich der NMDA-Rezeptor-Antagonismus durch MK-801 auf den extrazellulären Glutamatspiegel, die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies aus?
Kann es durch MK-801 zu neurodegenerativen Phänomenen kommen?
Wie werden diese Effekte durch das Psychopharmakon Haloperidol moduliert?
2. Wie wirkt sich Kreatin auf Zellen aus, die mit MK-801 behandelt werden oder oxidativem Stress ausgesetzt sind?
Dabei soll auf die Energielevel, die extrazelluläre Glutamatkonzentration, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Zellvitalität eingegangen werden.
Kommt es durch Kreatin zu einer Veränderung der Empfindlichkeit des NMDA-Rezeptors?

3 Material für Präparation und Zellkultur

3.1. Geräte

Sterile Werkbank	Hera Safe, Heraeus Instruments, Haunau
Luminometer	Lumat LB 9507 EG&G Berthold, Bad Wildbad
Spektrofluorimeter	Perkin Elmer, Beaconsfield, England
Analysenwaage	Explorer, Ohaus, Pine Brook, USA
Inkubator	CB 20, Binder, Tuttlingen
Stereomikroskop	PZM-B, World Precision Instruments inc., Sarasota, USA
Kaltlichtquelle	KL 1500 Electronic, Leica, Wetzlar
Vortex	Genie 2, Scientific Industries inc., Bohemia, USA
Laborzentrifuge	5804 Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
pH-Meter	CG 711, Schott, Mainz
Elisa Reader	Tecan Sunrise™ ELISA Reader, Crailsheim
Pinzetten, spitz	Dumont no. 5 - Assorted Styles, FST, Heidelberg
Pinzetten, abgewinkelt	Dumont no. 5/45 - Standard Tip, FST, H.
Federschere	Vannas Spring Scissor, 3mm Blades, FST, H.
Scheren	Extra Fine Bonn Scissor, FST, H. Standard Scissor - Straight Sharp/Blunt, FST, H.

3.2 Einmal-Laborbedarf

Zellkulturplatten	Nalge Nunc International, 24 und 48 well, Rochester, NY, USA
Bottle Top Filter	90mm, 500ml, Nalge Nunc International, Rochester, England
Spritzenvorsatzfilter	FP 30/0,2 CA-S, Whatman Schleicher & Schüll, Dassel
Petrischalen	Falcon 35+100 mm Durchmesser, Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA
Röhrchen (Polypropylen)	15+50 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten	Acryl 10x10x48 mm Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Lösungen und Reagenzien

Soweit nicht anders spezifiziert werden die Reagenzien von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen

Nährmedium	Neurobasal B27 Supplement ohne Antioxidantien (-AO) 0,5 mM Glutamin Glutamax 100x Fertiglösung 50µg/ml Gentamycin (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, UK)
Digestionslösung	6 ml PBS-BSA (Bovines Serum-Albumin) 0,5 mg/ml Papain 20 µg/ml DNase I, bei 37°C solubilisiert Sterilfiltration durch einen Spritzenvorsatzfilter
PBS (Phosphatgepufferte Saline)	140 mM NaCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM NaHPO_4 2,7 mM KCl Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Bottle-Top-Filter Lagerung bei Raumtemperatur, pH: 7,4
Poly-L-Ornithin	100x Stammlösung (1,5 mg/ml) Aufgeteilt in Aliquots und bei -20°C gelagert (6 Monate haltbar) Arbeitslösung (150 µg/ml) gelagert bis zu 1 Monat bei 4°C Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Bottle-Top-Filter
Trypan Blau	Fertiglösung 0,4%, Lagerung bei 4°C

4 Methodik

4.1 Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen aus Rattenembryonen

4.1.1 Vorbereitungen für die Präparation

Am Vortag der Präparation wurden 48-Well-Platten mit einem Durchmesser von 12 mm pro Kavität mit je 200 µl Poly-L-Ornithin (150 µg/ml) beschichtet, das zuvor durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert wurde. Die beschichteten Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Präparation der Hippocampi wurde Poly-L-Ornithin von den Platten abgesaugt, mehrfach mit sterilem PBS gespült und die Platten in der Sterilwerkbank getrocknet.

Das Nährmedium sowie die Digestionslösung wurden am Tag der Präparation frisch zubereitet (siehe Materialteil). Mehrere Röhrchen (15 und 50 ml) sowie Petrischalen (35 und 100 mm) wurden mit eiskaltem PBS gefüllt und auf Eis gestellt.

Die gesamte Präparation wurde unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt, die anschließende Kultivierung und Behandlung der Zellen unter einer sterilen laminar flow Werkbank. Benötigte Medien und Medienzusätze wurden unter Verwendung von Einmal-Sterilfiltern mit 0,2 µm sterilfiltriert. Präparationswerkzeuge wurden bei trockener Hitze von 180°C 30 min lang sterilisiert. Kunststoffgegenstände und Puffer wurden bei feuchter Hitze von 121°C und einem Dampfdruck von 200 kPa 15 min lang autoklaviert.

Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzgesetzen und anerkannt vom lokalen bioethischen Komitee ausgeführt.

4.1.2 Isolation der Embryos

Für die Versuche wurde *Rattus norvegicus* Stamm Long-Evans eingesetzt (Elevage Janvier, Frankreich). Unter Chloroformnarkose erfolgte unmittelbar nach Eintreten des Atemstillstandes die Dekapitation des trächtigen Muttertiers am Tag 17/18 post conceptionem (ED 17/18). Als Tag 1 (ED 1) wurde der erste Tag bezeichnet, an dem nach der Empfängnis ein vaginaler Pfropf sichtbar wurde, der die Trächtigkeit des Tieres signalisiert. Nach Desinfektion des gesamten Abdomens mit 70%igem Alkohol wurde die Bauchdecke der Ratte von der Vagina bis zur Thoraxhöhle eröffnet, indem mit einer chirurgischen Pinzette die Haut unter Spannung gebracht und mit der Schere die Haut entlang der Mittellinie durchtrennt wurde. Nach Durchtrennung des Peritoneums wurde der Uterus durch Anheben der Uterushörner und Durchtrennung der Peritonealstrukturen und Gefäßbündel entnommen, sofort mit sterilem, eiskaltem PBS gespült und in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis gestellt. Zügig wurde nun die Isolation der Rattenembryonen durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Uterus mit einer kleinen Schere eröffnet, der Dottersack perforiert und die Embryos (meist eine Anzahl von 10 bis 12) entnommen. Mit einer kleinen spitzen Schere wurden hochthorakal die Köpfchen abgetrennt und in einem mit eiskaltem PBS gefüllten Röhrchen auf Eis gestellt. Die weitere Präparation der Köpfchen erfolgte in auf Eis gestellten und mit vorgekühltem PBS gefüllten Petrischalen. Jedes einzelne Köpfchen wurde mit zwei Dumont-Mikropinzetten, wovon eine gebogen war, präpariert. Dabei wurde mit der einen Pinzette das Köpfchen an der Nackenmuskulatur fixiert, um mit der zweiten Pinzette am Hinterkopf bei der Lambdanaht beginnend bis zum Bregma die Kopfhaut sowie die noch weichen Schädelplatten zu entfernen. Durch eine sehr oberflächliche Stichinzision am Vertex und anschließendes Abschälen wurde nun die Dura mater entfernt. Daraufhin wurde das nunmehr freiliegende Gehirn durch Einführen der gebogenen Dumont-Pinzette zwischen Schädelbasis und den kaudalen Hirnteilen von der Schädelbasis entfernt und mit einer gekrümmten Pinzette in eine neue Petrischale mit eiskaltem PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Stereomikroskop unter Anwendung einer fiberoptischen Kaltlichtquelle. Mit Hilfe der Dumont-Pinzetten wurde der hintere Anteil des ZNS entfernt, darunter das Zerebellum, die Pons, der Hirnstamm und der zervikale Anteil des Rückenmarks. Als nächstes erfolgte die Trennung beider Hemisphären an der Mittellinie. An jeder Hemisphäre wurden nun das Septum, der Thalamus sowie der Hypothalamus vom Kortex entfernt. Daraufhin wurde der Hippocampus als ein etwas dickerer Anteil der Hemisphäre entlang der medialen Kante des Kortex sichtbar. Mit der Mikroschere

wurden nun das Striatum und der Riechkolben vom Kortex entfernt. Daraufhin wurde longitudinal entlang der Grenzlinie zwischen Hippocampus und Kortex ein Schnitt mit der Mikroschere geführt. Dieser Schnitt konnte entweder von der ventralen oder auch von der dorsalen Seite des Kortex erfolgen. Die darauffolgende Entfernung der weichen Meningen und des Plexus Choroideus sollte besonders vorsichtig geschehen, da es sehr leicht zu einer Verletzung des Hippocampus kommen kann. Das nun gewonnene hippocampale Gewebe, frei von sämtlichen Blutgefäßen, wurde in einem Röhrchen voll sterilem PBS auf Eis gestellt und so insgesamt höchstens eine halbe Stunde gelagert. Alle bisherigen Schritte wurden auch mit allen weiteren Köpfchen vollzogen und die gewonnenen Gewebe wurden in dem Röhrchen gesammelt. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden unter der sterilen Werkbank statt.

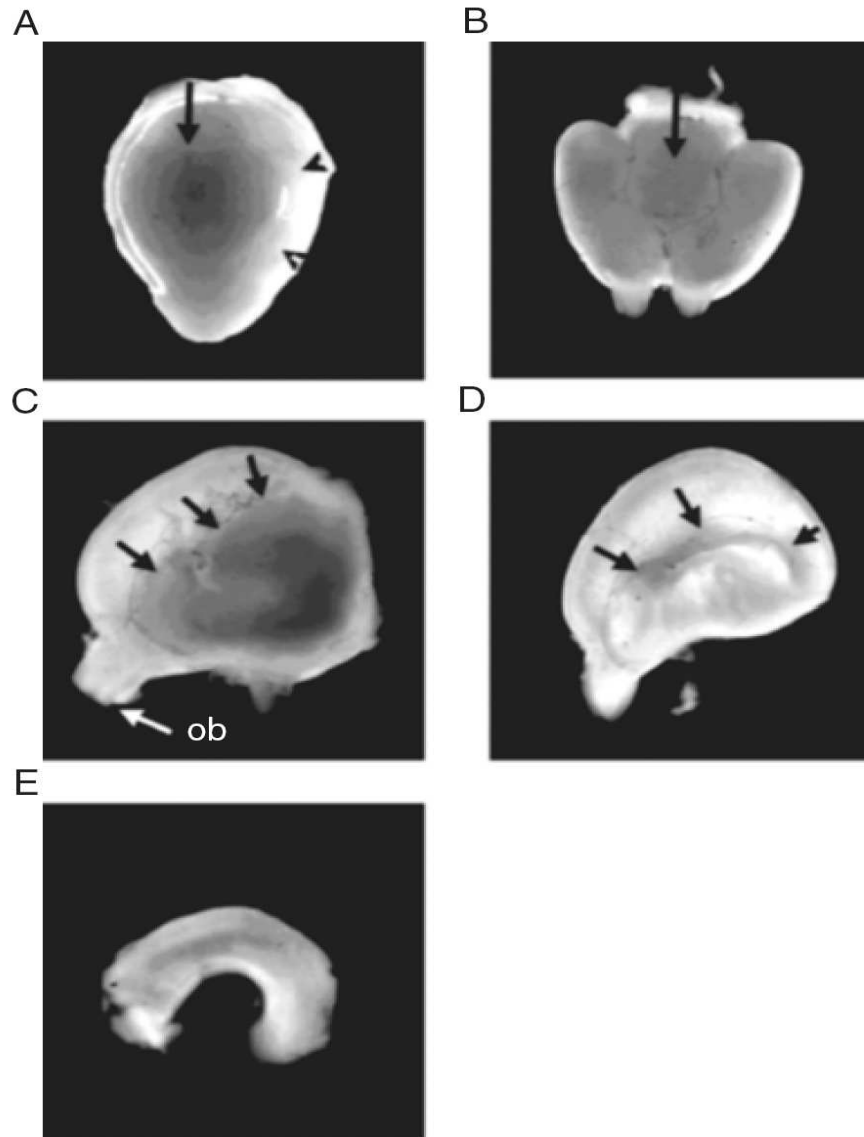


Abb. 6: Präparation eines embryonalen Rattenhippocampus

(A) Mit der einer Dumont-Pinzette wird das Köpfchen an der Nackenmuskulatur fixiert, um mit der zweiten Pinzette am Hinterkopf bei der Lambdanaht beginnend (Pfeil) bis vor zu Bregma die Kopfhaut sowie die noch weichen Schädelplatten zu entfernen. Auch das umgebende Gewebe wird entfernt (Pfeilspitzen). (B) Mit Hilfe der Dumont-Pinzetten wird der hintere Anteil des ZNS entfernt, darunter das Zerebellum, die Pons, der Hirnstamm und der zervikale Anteil des Rückenmarkes. Mit der ventralen Seite des Gehirns nach oben, werden beide Hemisphären mit Zuhilfenahme der beiden Pinzetten an der Mittellinie getrennt (Pfeil). (C) Im nächsten Schritt wird an jeder Hemisphäre das Septum und das diencephale Gewebe (Thalamus und Hypothalamus) vom Kortex entfernt (Pfeile). Der Riechkolben ist markiert (ob=olfactory bulb). (D) Entlang der medialen Kante des Kortex ist nun der Hippocampus als ein etwas dickerer Anteil der Hemisphäre sichtbar (Pfeile). (E) Nachdem mit der Mikroschere das Striatum und der Riechkolben vom Kortex entfernt wurden, wird longitudinal entlang der Grenzlinie zwischen Hippocampus und Kortex ein Schnitt mit der Mikroschere geführt, um den Hippocampus von dem Kortex zu lösen. Dieser Schnitt konnte entweder von der ventralen oder auch von der dorsalen Seite des Kortex erfolgen. Die darauffolgende Entfernung der weichen Meningen und des Plexus Choroideus sollte besonders vorsichtig geschehen, da es sehr leicht zu einer Verletzung des Hippocampus kommen kann (105).

4.1.3 Zerkleinerung und Verdauung des Hirngewebes

Das präparierte Gewebe wurde dissoziiert durch mechanische Homogenisierung in einer „Hank's balanced salt solution“ (HBSS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , die mit 10 mM HEPES bei einem pH von 7,4 gepuffert und mit 1 mM Natrium-Pyruvat und 4% Albumin aus Rinderserum ergänzt wurde. Dazu wurde das Gewebe in der zuvor angefertigten Digestionslösung 30 Minuten lang unter gelegentlichem Schütteln und Gebrauch des Vortexgerätes inkubiert. Wichtig war dabei, auf eine sorgfältige und gleichmäßige Zerkleinerung bzw. Verdauung des Hirngewebes unter Vermeidung von Luftblasen zu achten, um später einen homogenen Zellrasen gewinnen und Klumpenbildung verhindern zu können. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde der Überstand der Digestionslösung abgegossen und je 2 ml des Nährmediums (Zubereitung siehe Material-Kapitel) hinzugegeben. Die Lösung wurde mehrfach durch eine Eppendorf-Pipette mit blauem Aufsatz aspiriert, um das Gewebe zu zerkleinern. Nach mehreren Aspirationsvorgängen und Erhalten einer homogenen Lösung, wurden die Röhrchen bis zur Marke von 7 ml mit dem Nährmedium aufgefüllt. Zelldebris wurde in zwei Zentrifugationsschritten bei jeweils 800 g für 15 Minuten entfernt. Das nach der ersten Zentrifugation gewonnene Pellet wurde nach Abgießen des Überstandes durch sanfte Zerkleinerung durch einen gelben Kunststoffpipettenaufsatz mit 2 ml des Nährmediums resuspendiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurde wiederum der Überstand abgegossen und die sedimentierten Zellen mehrfach durch die Pipette gezogen, um es mit dem Medium gleichmäßig zu vermischen und es dann in einem geeigneten Volumen zu resuspendieren.

4.1.4 Zählung und Kultivierung der Zellen

Die Menge des benötigten Volumens richtete sich dabei nach der Zellzahl. Dafür wurden die lebenden (d.h. den Farbstoff Trypan Blau exkludierenden) Zellen in einem Hämatozytometer (Zählkammer nach Neubauer, modifiziert) nach Zugabe von 20 μl der Suspension zu 20 μl einer 0,4%igen Trypan Blau Lösung gezählt. In einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen/well der 48-well-Platte wurden die Zellen auf eine entsprechende Anzahl von 48-well-Platten ausgesät und in dem definierten Medium bei 5% CO_2 in einem feuchtigkeitsgesättigten Inkubator bei 37°C kultiviert. Nach 4 h wurden nichtadhärierende und tote Zellen abgesaugt. Bereits einige Stunden nach der Aussaat konnte man bei 200facher Vergrößerung unter dem Mikroskop morphologisch intakte Neuronen erkennen, die Dendriten und Axone ausbildeten, um damit interneuronale Verbindungen zu knüpfen, die schon nach wenigen Tagen als dichte neuronale Netze sichtbar wurden (Abb.7).

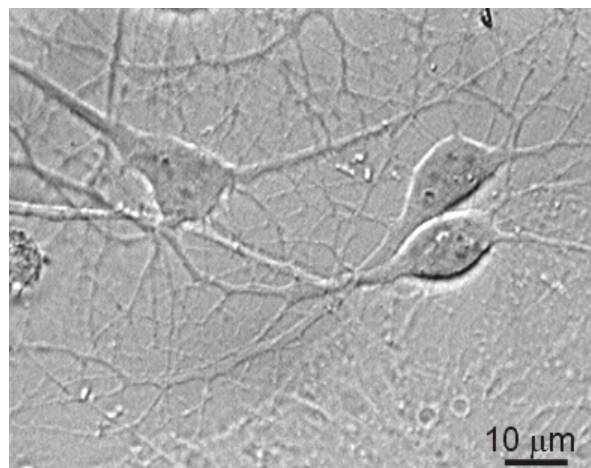


Abb. 7: Hippocampale Zellen in eigener Kultivierung (DIV 12)

Erkennbar ist ein neuronales Netz aus Dendriten und Axonen, das sich zwischen den einzelnen Neuronen ausgebildet hat

Alle 3-4 Tage sowie unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Experimente fanden i.d.R. am 12.-15. Tag nach der Aussaat statt (12./15.Tag *in vitro* = 12/15 *days in vitro* = DIV 12/15) statt. Die Qualität der Zellkultur wurde routinemäßig mit Hilfe von Vitalitätstests, morphologischen Parametern und Immunfärbungen für Neuronen- und Gliazellmarkern bestimmt. Die durch GFAP Immunfluoreszenz dargestellten Gliazellen machten nur <1% der gesamten Zellpopulation aus, während >99% der Zellen NeuN und β -3-Tubulin (TUJ-1) als neuronale Marker exprimierten.

4.1.5 Neuronale Entwicklung primärer dissoziierter hippocampaler Zellen

Der Hippocampus eignet sich durch seine begrenzte Anzahl an Neuronentypen und deren Vernetzungen besonders als Modellsystem für die Zellkultivierung.

Da die mechanische Zerkleinerung der hippocampalen Zellen während der Präparation zu einem Abreißen der vorhandenen Zellfortsätze führt, bzw. noch undifferenzierte Zellen ohne axonale oder dendritische Prozesse im embryonalen Hirn vorliegen, lassen sich nach der Aussaat der Zellsuspensionen in die Kulturschalen unter dem Mikroskop große, runde Zellen ohne Fortsätze erkennen. Jedoch beginnen die Zellen in einem geeigneten Milieu (Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, Vitaminen, Glutamat etc.) bereits einige Stunden nach ihrer Aussaat mikroskopisch sichtbare Fortsätze auszubilden, zum Teil kann dabei schon zwischen dendritischen und den längeren axonalen Fortsätzen unterschieden werden. Am zweiten Tag nach der Aussaat kann man eine deutliche Polarisierung der Neuronen feststellen, wodurch die Unterscheidung zwischen Axonen und den bis zu fünfmal schneller wachsenden Dendriten leichter fällt als zuvor (31). Die damit geknüpften interneuronalen Verbindungen werden schon nach wenigen Tagen als dichte neuronale Netze unter dem Mikroskop sichtbar (siehe Abb.7). Bereits an DIV 1 kann man morphologisch zwischen den beiden hauptsächlich vorkommenden Zelltypen unterscheiden: Pyramidenzellen und Körnerzellen. Pyramidenzellen sind pyramidenartig geformt mit einem Soma von etwa 7-12 μm . Körnerzellen haben ein rundliches Soma und erscheinen mit ihren ca. 5-8 μm etwas kleiner.

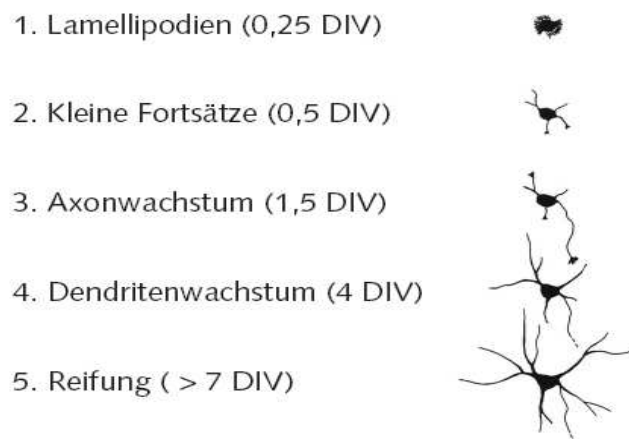


Abb. 8: Entwicklung der neuronalen Polarität in kultivierten hippocampalen Zellen

Fötale hippocampale Neurone erreichen ihre charakteristische polarisierte Morphologie in einer Sequenz von wohldefinierten Schritten (31)

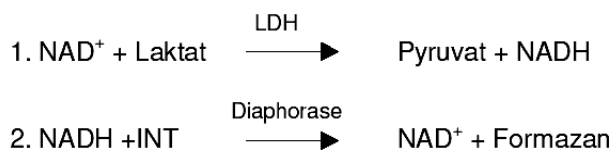
4.2 Enzymtests

4.2.1 LDH-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellvitalität kann über die Quantifizierung von Membranschäden bestimmt werden. Eine Möglichkeit davon ist es, zytosolische Enzyme im Kulturmedium zu messen, die aus den Zellen nach Schädigung diffundiert sind. Dabei ist die Enzymaktivität direkt proportional zur Anzahl der lysierten Zellen.

Die Laktatdehydrogenase befindet sich im Zytoplasma fast aller Zellen und wird bei Zellschädigung schnell an das Kulturmedium abgegeben. Die Enzymaktivität der LDH wurde mit Hilfe des CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay von Promega gemessen.

Zunächst wird Laktat durch die freigesetzte Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$. In der sich anschließenden durch Diaphorase katalysierten Redoxreaktion wird das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu dem roten Formazansalz reduziert, das photometrisch quantifiziert werden kann.



Für diesen Test wurden hippocampale und frontale Zellen in der Regel 24h mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert, um danach deren Wirkung auf die Zellvitalität zu messen. Als Referenz wurde die zumeist minimale LDH-Freisetzung im Überstand von unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Zur Durchführung des LDH-Tests wurden je 50 μl des Kulturüberstandes in eine transparente 96-well-Platte pipettiert und mit je 50 μl LDH-Substratreagenz versetzt. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde die Absorption der Proben mit einem Elisa Reader bei 490 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. LDH-Lösungen mit bekannter Aktivität dienten als Positivkontrolle.

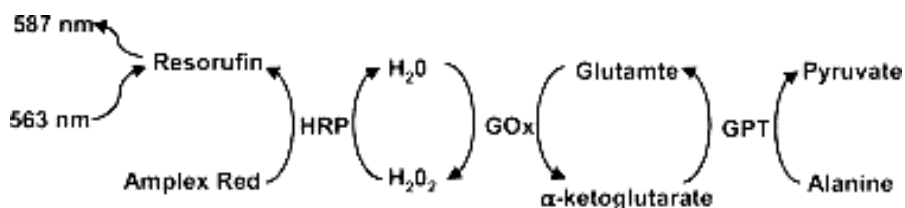
4.2.2 Messung der extrazellulären Glutamatkonzentration im Zellkulturüberstand

Extrazelluläres Glutamat wurde mit Hilfe des Amplex Red Glutamic Acid/glutamate oxidase Assay Kit von Invitrogen gemessen, das sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

- Amplex Red Reagenz
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Merettichperoxidase (HRP)
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
- Reaktionspuffer (0,5 M Tris-HCL, pH 7,5)
- L-Glutamat Oxidase aus *Streptomyces* sp.
- L-Glutamat-Pyruvat Transaminase aus Schweineherz
- L-Glutamat (MW= 187,1)
- L-Alanin (MW= 89,1)

Dieses Verfahren ist sehr sensitiv um die L-Glutamat-Konzentration sowie die Glutamat-Oxidase-Aktivität *in vitro* zu messen (Chapmann & Zhou, 1999; Zhou et al., 1997).

In der ersten Reaktion wird L-Glutamat durch die Glutamat-Oxidase zu α -Ketoglutarat, NH_3 und H_2O_2 oxidiert. L-Alanin und L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase werden benötigt um L-Glutamat durch eine Transaminierung von α -Ketoglutarat zu gewinnen. H_2O_2 reagiert mit 10-Acetyl-3,7-Dihydroxy-Phenoxazin (= Amplex Red Reagenz) in einem Verhältnis von 1:1 mit dem Katalysator HRP (Merettichperoxidase) zu H_2O und Resorufin, einem fluoreszierenden Produkt.



Da das Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaximum von Resorufin bei etwa 571 nm bzw. 585 nm liegt, kann es zu kleinen Interferenzen durch Autofluoreszenz kommen. Die besonders hohe Sensitivität dieses Tests resultiert daraus, dass die

Reaktionszyklen erst dann zum Erliegen kommen, wenn das gesamte Glutamat aufgebraucht wurde. Durch die mehrmalige Wiederholung der ersten Reaktion kommt es zu einer Anhäufung von immer mehr H_2O_2 , das mit Amplex Red weiter zu dem fluoreszierenden Resorufin reagiert.

Für diesen Test wurden hippocampale Zellen 24 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert, um die Wirkung auf die Glutamatkonzentration im Extrazellulärraum zu messen. Diese Werte wurden dann mit der extrazellulären Glutamatkonzentration unbehandelter Kontrollzellen verglichen. Zur Quantifizierung wurden L-Glutamatstandards mitgeführt. Zur Überprüfung der Aussagekraft der Methode wurden jeder Messung eine Positiv- und eine Negativprobe beigelegt.

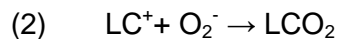
4.3 Fluoreszenztests

4.3.1 Quantitativer Nachweis von Superoxidanionen

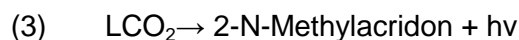
Die Bestimmung der intra- und extrazellulären O_2^- -Produktion erfolgte mit Hilfe des Lucigenin-Chemilumineszenz-Tests (Gyllenhammar 1987). Dabei reagiert das Di-Kation des Lucigenin (Bis-N-Ethylacridinniumnitrat) durch eine Einelektronenreduktion zum Lucigenin-Kationradikal (*Reaktionsschema 1*):



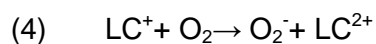
Das Lucigenin-Kationradikal reagiert seinerseits mit O_2^- unter Bildung eines instabilen Dioxoethans, welches spontan zerfällt (*Reaktionsschema 2*):



Das dabei entstandene, energetisch angeregte Acridin kehrt unter Photonenemission spontan in den Ruhezustand zurück (*Reaktionsschema 3*):



Die methodische Validität der Lucigenin-Lumineszenz zur Messung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde in der Literatur kritisch hinterfragt: Die Elektronen-Spin-Resonanz konnte zeigen, dass Lucigenin aufgrund eines Redox-Cyclings *per se* Superoxidanionen erzeugt. Aus diesem Grund tritt auch unabhängig von der Gegenwart biologischer Systeme eine Lichtemission auf (75) (*Reaktionsschema 4*):



Zur Vermeidung dieses systemischen Fehlers wurde hier die Messung der Lucigenin-Chemilumineszenz nicht zur *Quantifizierung* basaler O_2^- -Produktionsraten verwendet, sondern nur zur Bestimmung veränderter O_2^- -Bildungsraten relativ zu den Kontrollbedingungen in Enzymaktivierungsexperimenten. In der Fachliteratur wird die Anwendung dieser Methode für die eben erwähnte Fragestellung akzeptiert (48).

Zum quantitativen Nachweis von Superoxidanionen in hippocampalen Zellen wurden diese nach 11-15 Tagen in Kultur (11-15 DIV) mechanisch abgeerntet, durch wiederholte Aspiration durch eine 18 G Nadel dissoziiert und schonend zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde wiederholt in Neurobasal Nährmedium resuspendiert. Aliquots der Zellsuspension wurden in ein Teströhrchen transferiert und die spontane Sedimentation abgewartet, um Einflüsse von Lichtstreuungseffekten (Tyndall-Effekt) auf die Detektion der Chemilumineszenz zu minimieren. Nach Zugabe von Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-Biacridiniumdinitrat) in einer Endkonzentration von 50 μM wurden die Röhrchen in die Messkammer des Luminometers gestellt (LB9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland). Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation im Dunkeln zur Reduktion der Autolumineszenz wurde die Lichtemission in zwei Sekunden Intervallen gemessen. Die Hintergrund-Chemilumineszenz (Thermisches Rauschen des Photomultipliers und Spontanlumineszenz von Reagenzien und Plastikmaterial) wurde simultan in Kontroll-Lösungen ermittelt und subtrahiert. Die Spezifität der Chemilumineszenz für die stimulierte O_2^- -Abgabe wurde verifiziert durch die Gabe von SOD, der zellpermeablen, SOD-imitierenden MnTBAP (Mangan[III]tetrakis[4-benzoesäure]porphyrin), oder den Sauerstoffradikalfänger Tiron (4,5-Dihydroxy-1,3-Benzen-Disulfonsäureacetat).

Zur Messung unspezifischer, d.h. nicht zellgebundener Effekte jeweiliger Testsubstanzen auf den Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies in der Chemilumineszenz wurden Kontrollversuche im zellfreien Medium durchgeführt. Dabei wurden Xanthin Oxidase (0,025 U/ml) und Xanthin (100 μM) in PBS inkubiert, um eine kontinuierliche Superoxidproduktion zu gewährleisten. Nach Zugabe von Lucigenin und Erhalt eines stabilen Chemilumineszenzsignals wurde die zu untersuchende Testsubstanz in ansteigenden Dosierungen hinzugegeben. Die Chemilumineszenz wurde dabei in einem Luminometer gemessen und die Hintergrund-Chemilumineszenz gleichzeitig subtrahiert. Die Spezifität der Chemilumineszenz für Superoxidanionen wurde durch die Zugabe von Superoxiddismutase verifiziert.

4.3.2 Intrazelluläre ATP-Messung

Die Quantifizierung des intrazellulären ATP in hippocampalen Zellen erfolgte über die Messung des Luciferin-Luciferase-Chemilumineszenz-Signals aus Zelllysaten. Die resultierende ATP-Menge zeigt die Menge des von lebenden Zellen gebildeten ATP an und stellt damit einen Vitalitätsmarker dar.

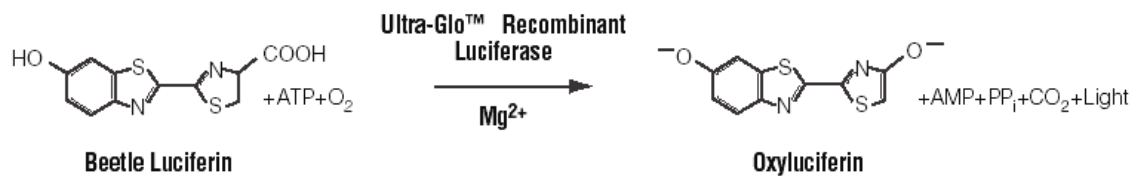


Abb. 9: Luciferase-Reaktion

Die Oxygenierung von Luciferin wird in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen, ATP und Sauerstoff durch das Enzym Luciferase katalysiert [<http://www.promega.com/tbs/tb288/tb288.pdf>].

Das bei der Reaktion entstandene Lumineszenzsignal ist direkt proportional zum ATP-Gehalt (28). Dabei wurde das CellTiter-Glo Reagenz in einem Verhältnis von 1:4 ins Kulturmedium gegeben. Nach 10 min Inkubation wurde die Lumineszenz bei 37°C gemessen.

4.3.3 Intrazelluläre Kalziummessung

Hippocampale Zellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) in Kalzium Pufferlösung (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 10 mM Glukose) wurden mit Fura 2/AM (1,25 μM) bei 37°C für 40 Minuten vorinkubiert. Nach einer 30 minütigen Ruhephase zur Esterspaltung des intrazellulären FURA 2/AM wurden die Zellen in einer Mikroliterküvette in ein Perkin-Elmer LS50B Spektrofluorimeter, ausgestattet mit einer temperaturkontrollierten Küvettenkammer, die eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet, transferiert. Die Experimente konnten durchgeführt werden, nachdem unter sanftem Rühren mittels eines Magnetrührers stabile Fluoreszenz Ratios über mehrere Minuten bei wechselnder Exzitation mit Wellenlängen von 340 bzw. 380 nm bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen werden konnten. Als Positivkontrolle der Zellvitalität erfolgte nach Ablauf des Experiments die Inkubation mit dem Ca^{2+} -ATPase Inhibitor des endoplasmatischen Retikulums Thapsigargin (10 μM), das im Regelfall einen raschen Anstieg des zytosolischen Kalziums induziert.

4.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Jeder Datenpunkt einer Auswertung repräsentiert den Mittelwert von drei bis sechs verschiedenen Messungen. Jedes Experiment wurde unabhängig voneinander in mindestens dreifacher Ausführung durchgeführt und in weiteren Zellpräparationen mindestens zweimal repliziert.

Es kann innerhalb der beschriebenen Versuchsreihen von einer Normalverteilung ausgegangen werden, unter der Voraussetzung dass die Experimente an einem Versuchstag und mit derselben Charge von Versuchsmaterial und Reagenzien durchgeführt wurden. In diesem Fall erfolgte die Auswertung der Daten mit Hilfe des zweiseitigen Student's *t*-Tests bzw. der ANOVA-Methode (SPSS 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Um Verbindungen zwischen Markern zu berechnen wurde der Spearman's Korrelationskoeffizient verwendet. Im Zweifelsfall konnte die Abweichung von der Normalverteilung mit einem Algorithmus des Programms SPSS bestimmt werden. Ausreißer wurden mit dem Grubbs-Test identifiziert und von weiteren Analysen ausgeschlossen. Unterschiede bei der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden bei den Auswertungen der Experimente als statistisch signifikant (*) gewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben und mit dem Programm Sigma Plot Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) graphisch aufgearbeitet.

5 Ergebnisse

5.1. Glutamaterge Dysbalance und oxidativer Stress in einem *in vitro* Modell der Schizophrenie basierend auf der Applikation von MK-801

5.1.1 Anstieg des intrazellulären Kalziums sowie der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies nach Triggerung durch Glutamat

Mit Hilfe des FURA-2/AM imaging wurde ein signifikanter Kalziumanstieg nach Glutamatgabe in hippocampalen Neuronen registriert. Diese noch unpublizierten Daten wurden freundlicherweise von dem Betreuer der vorliegenden Arbeit (Dr. Just Genius, Arbeitsgruppe Molekulare und Klinische Neurobiologie, Leitung: Prof. Dr. Dan Rujescu) zur Verfügung gestellt.

Dabei wurden die Kalziumströme fluoreszenzratiometrisch verfolgt, nachdem ein Glutamatbolus von 100 μM in den Überstand adhärenter Hippocampusneurone gegeben wurde. Zusätzlich wurden *regions of interest* (ROI) über dem Zellsoma platziert und die zeitlichen und quantitativen Verhältnisse des Kalzium-Anstiegs in diesen Regionen dargestellt (Abb. 10a, b).

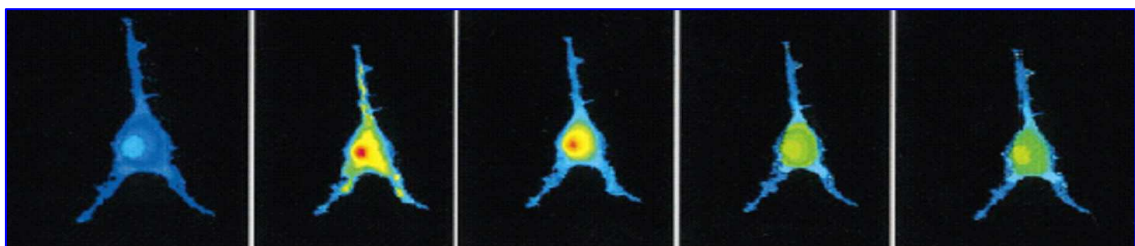


Abb. 10a: Effekt von Glutamat auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Kalziumanstieg in einem einzelnen, repräsentativen hippocampalen Neuron nach Glutamatrigger (Glutamatbolus von 100 μM). Die Messung erfolgte mit Hilfe des FURA-2/AM-imaging, die Darstellung des hippocampalen Neurons in Falschfarbentechnik (Gelb/Rottöne zeigen Regionen erhöhter Kalziumkonzentrationen an).

Basale zytoplasmatische Kalzium-Konzentrationen waren dabei (bei erheblicher interindividueller Streuung) im Bereich von 50-150 nM angesiedelt. Unter supramaximaler Stimulation mit einem 100 μM Glutamatbolus wurden Werte von bis zu 500 nM registriert (range 24-514 nM). Das Maximum wurde durchschnittlich nach 2 Minuten erreicht (range 98-189 Sekunden). Auf diesem Level verblieben die Kalzium-

Konzentrationen für mehrere Minuten, um dann wieder zur Ausgangskonzentration zurückzukehren.

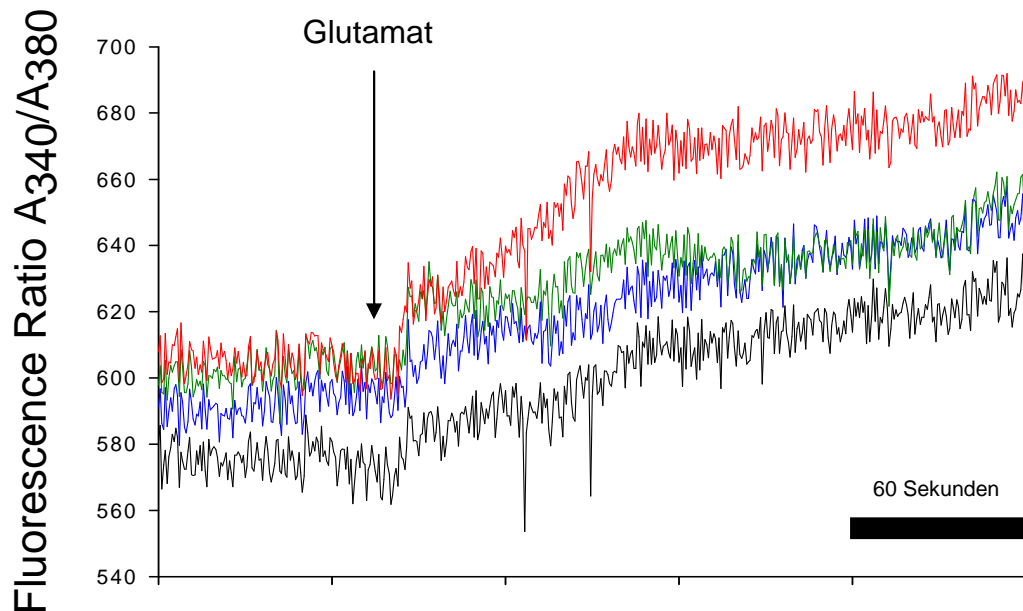


Abb. 10b: Effekt von Glutamat auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Kalziumanstieg in vier verschiedenen hippocampalen Neuronen (dargestellt in vier verschiedenen Farben) nach Glutamattrigger (Bolus von 100 μ M Glutamat), gemessen in Echtzeit mit Hilfe des FURA-2/AM imaging.

Mit welcher Zeitcharakteristik Glutamat als mögliche Folge der angestiegenen intrazellulären Kalziumkonzentration auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (O_2^-) triggert, wurde mit Hilfe der Lucigenin-Chemilumineszenz in Echtzeit verfolgt. Dazu wurde zunächst die basale Produktion von O_2^- in einer Suspension hippocampaler Nervenzellen (DIV 12) in 2-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet. Nach Stabilisierung des Signals wurde anschließend der relative ROS-Anstieg nach Gabe eines Glutamatbolus von 100 μ M registriert (Abb. 11). Auf quantitative Angaben wurde dabei aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von geeigneten Standards für O_2^- verzichtet. Innerhalb weniger Millisekunden nach Zugabe des Glutamatbolus war ein rascher Anstieg der Chemilumineszenz um ein Vielfaches zu verzeichnen, der einem Maximum innerhalb der ersten 10 bis 20 Sekunden zustrebte. Innerhalb von etwa einer Minute fiel die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wieder auf das basale Niveau zurück, um dann konstant auf diesem Level zu bleiben.

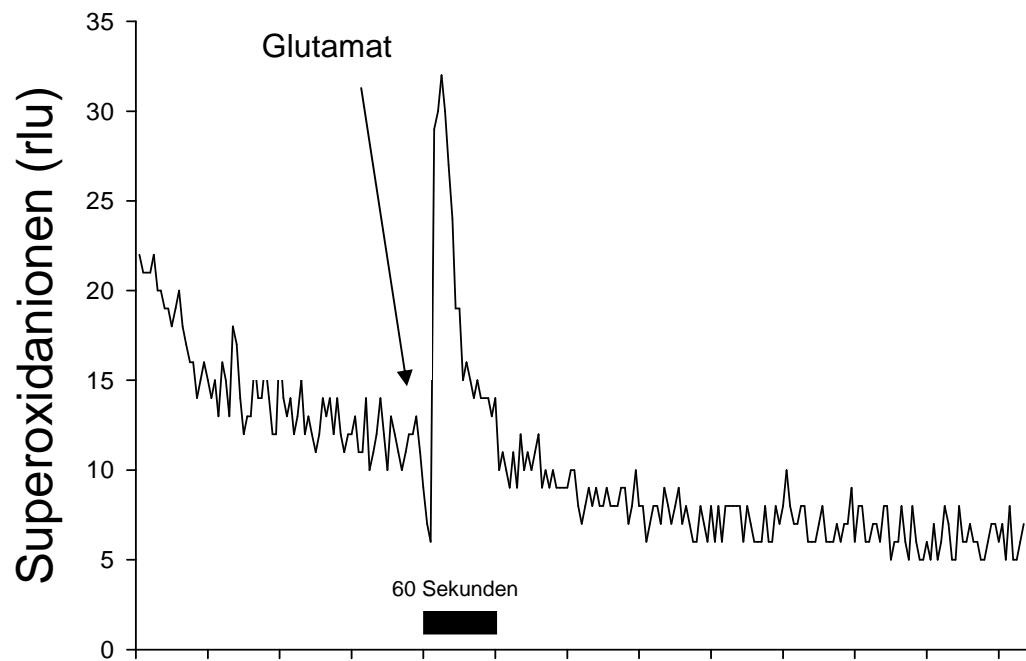


Abb. 11: ROS-Anstieg in einer Suspension hippocampaler Neuronen (DIV 5) nach Applikation eines Glutamatbolus von 100 μM , gemessen in Echtzeit mit Hilfe der Lucigenin-Chemilumineszenz.

5.1.2 Sekundärer Anstieg von Glutamat durch vermehrten oxidativen Stress oder MK-801-Gabe

Neben der oben dargestellten und auch aus der Literatur hinlänglich bekannten vermehrten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Glutamatgabe, konnte nachgewiesen werden, dass reaktive Sauerstoffspezies ihrerseits die extrazelluläre Glutamatausschüttung zu stimulieren vermögen.

So kam es bei mit H_2O_2 experimentell induziertem oxidativen Stress zu einem signifikanten Anstieg von extrazellulärem Glutamat. Bereits bei geringen Konzentrationen ($<100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), die unter physiologischen Bedingungen rasch der enzymatischen Entgiftung durch CAT und SOD unterliegen (*in vitro* ermittelte Halbwertszeit ca. 12-15 Minuten nach Applikation von $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$; Daten nicht gezeigt), wurde auch noch nach einer Latenz von 24 h (!), d.h. viele Stunden nach vollständiger Degradation von H_2O_2 ein deutlicher Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentrationen verzeichnet. Bei etwa $250 \mu\text{M}$ trat eine Sättigung dieser zellulären Antwort auf oxidativen Stress ein (Abb. 12).

Interessanterweise kam es durch den NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801, einer Substanz der eigentlich neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen werden, zu einer Verstärkung des H_2O_2 induzierten Glutamatanstieges (Abb. 12). Ebenfalls bemerkenswert war der bereits signifikante Anstieg der Glutamatkonzentrationen unter Kontrollbedingungen (d.h. keine Zugabe von H_2O_2) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ MK-801.

Da erhöhte ROS-Konzentrationen einen Glutamatanstieg triggern und gleichzeitig auch, wie im Kapitel zuvor gezeigt wurde, erhöhte Glutamatwerte zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies führen, kann man von einem System ausgehen, das sich immer weiter aufschauelt, möglicherweise unter Einbeziehung des ebenfalls rückgekoppelten Kalziumanstiegs. Dieser positive Feedback-Kreislauf kann zu exzessiv hohen Glutamat- und ROS-Werten führen und durch NMDA-Antagonismus mit MK-801 verstärkt, wenn nicht sogar initiiert werden.

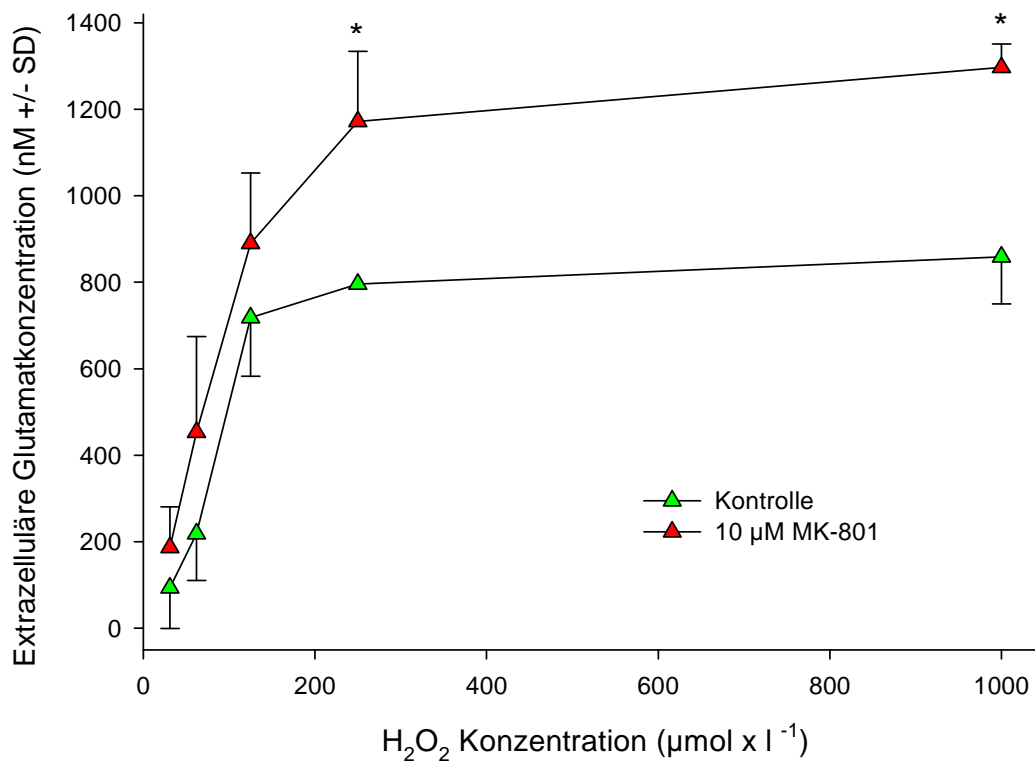


Abb. 12: Effekt von MK-801 auf den H₂O₂-induzierten Glutamatefflux

Hippocampale Zellen wurden nach Vorinkubation (2-4 h) mit 10 μM MK-801 ansteigenden H₂O₂-Konzentrationen über 24h ausgesetzt. Glutamat wurde mit Hilfe eines enzymatischen Tests im Zellkulturüberstand gemessen. Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte +/- SD von 6 verschiedenen Experimenten. * zeigt die statistische Signifikanz gegenüber den unbehandelten Zellen an (p<0,05).

5.1.3 Effekte des Kalziumchelators BAPTA/AM auf H_2O_2 induzierten oxidativen Stress und auf den Glutamatefflux

Die oben durchgeführten Messungen haben bereits ergeben, dass die Gabe von Glutamat zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führt. Reaktive Sauerstoffspezies wiederum führen zu einem erhöhten Glutamatefflux. Welche Rolle die Anwesenheit von Kalzium im Rahmen dieses Mechanismus spielen könnte, wurde mit Hilfe des Kalziumchelators BAPTA/AM untersucht. Diese zellpermeable Substanz entzieht dem Intrazellulärraum Kalzium.

Zunächst wurde der LDH-Efflux unter ansteigenden H_2O_2 -Konzentrationen gemessen, mit sowie ohne Vorinkubation mit 10 μM BAPTA/AM. Dabei konnte BAPTA/AM bei einer H_2O_2 Konzentration von 100 μM die Zytotoxizität vollständig antagonisieren (Abb. 13).

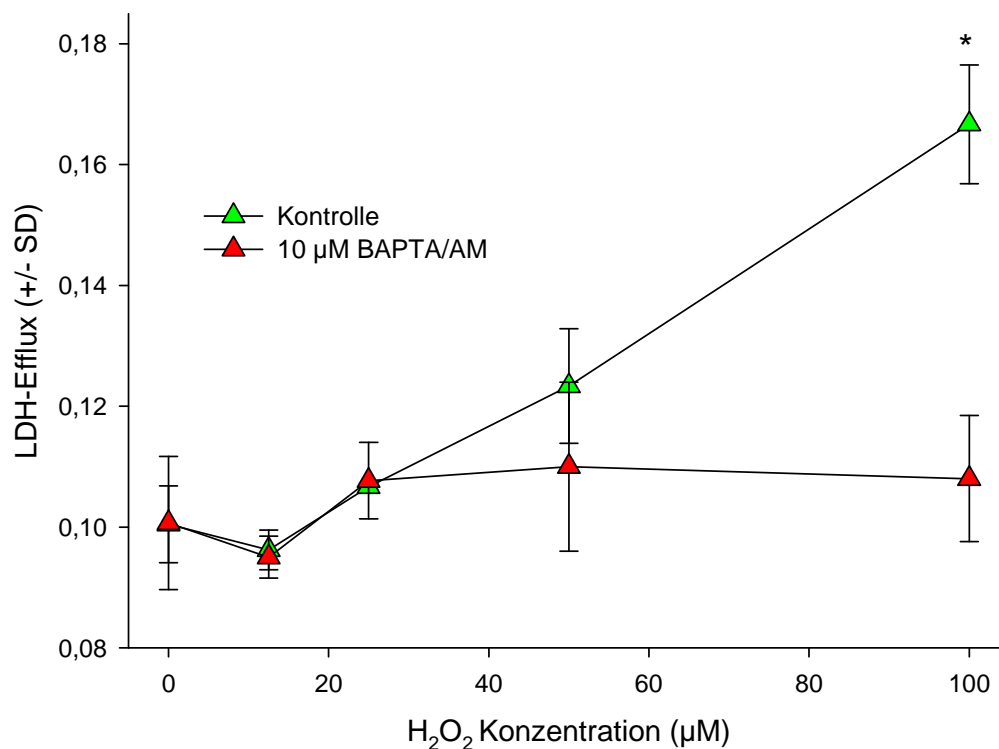


Abb. 13: Effekte von BAPTA/AM auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2

Bei einer Gruppe hippocampaler Neurone erfolgte eine vierstündige Vorinkubation mit 10 μM BAPTA/AM, die Kontrollgruppe wurde unbehandelt belassen. Daraufhin wurden die Zellen weitere 20 h mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen behandelt. Der nach 20 h gemessene LDH-Efflux in den Überstand stellt ein Maß für die Zytotoxizität dar. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert +/- SD von jeweils 6 verschiedenen individuellen Experimenten. * gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an ($p < 0,05$).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Effekt von ansteigenden H_2O_2 -Konzentrationen auf den Glutamatefflux gemessen, mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA/AM. Interessanterweise kam es durch den Entzug von intrazellulärem Kalzium zu einer vollständigen Antagonisierung des H_2O_2 vermittelten Glutamatefflux (Abb. 14). Zusammenfassend kann man sagen, dass der H_2O_2 -induzierte Glutamatanstieg über Kalzium vermittelt zu sein scheint. Dieser wiederum scheint eine zentrale Rolle bei der H_2O_2 vermittelten Zytotoxizität zu spielen.

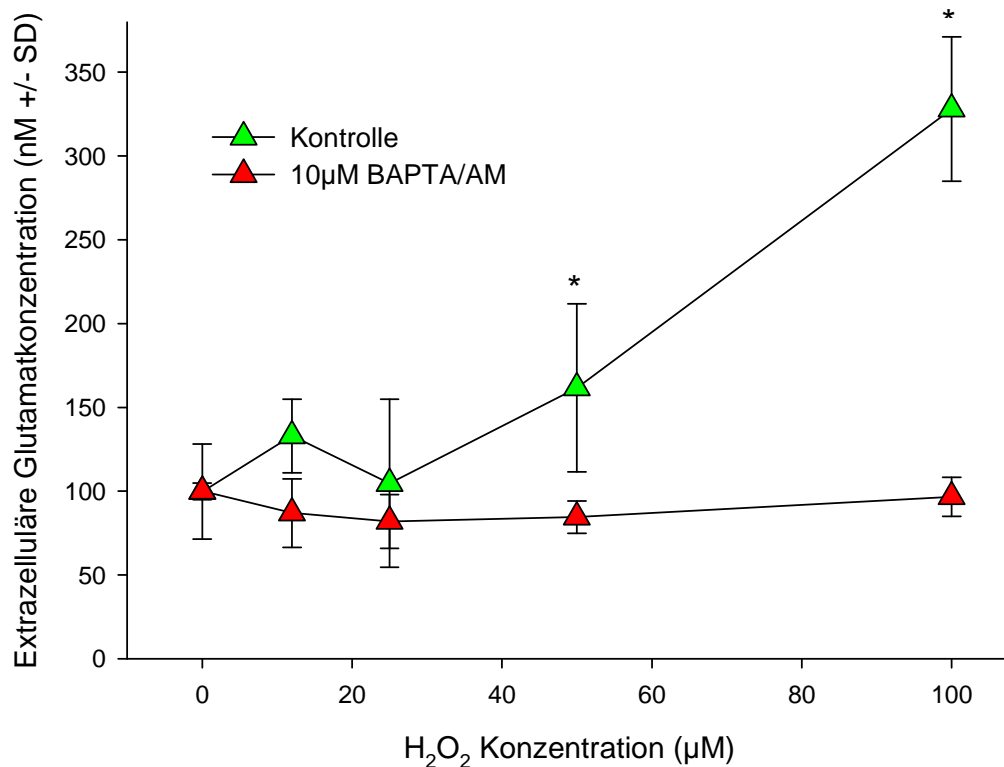


Abb. 14: Effekt von BAPTA/AM auf den H_2O_2 -induzierten Glutamatefflux

Hippocampale Zellen wurden nach Vorinkubation (2-4 h) mit 10 µM BAPTA/AM ansteigenden H_2O_2 -Konzentrationen 24 h ausgesetzt. Glutamat wurde mit Hilfe eines enzymatischen Tests im Zellkulturüberstand gemessen. Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte +/- SD von 6 verschiedenen Experimenten. * zeigt die statistische Signifikanz gegenüber den unbehandelten Zellen an ($p < 0,05$).

5.1.4 Spontane und glutamatinduzierte ROS-Produktion unter der Behandlung von MK-801 und Haloperidol

Die Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) als Antwort auf verschiedene dem Zellüberstand hinzugefügte Substanzen (MK-801 und/oder Haloperidol, sowie Glutamat) wurde mit Hilfe der Lucigenin Chemilumineszenz Analyse in einer Suspension hippocampaler Neuronen in Echtzeit gemessen. Hierbei stieg die basale ROS-Produktion vorübergehend sowohl durch 10 μ M MK-801 als auch durch Haloperidol an und blieb während der darauffolgenden Minuten erhöht. Die ROS-Levels bei der Kombination von Haloperidol und MK-801 zeigten hingegen nur einen geringen Anstieg. Nach Gabe eines Glutamatbolus von 100 μ M kam es bei den Kontrollzellen zu einer Erhöhung der ROS-Level. Diese Reaktion wurde durch MK-801 potenziert, ebenfalls durch Haloperidol. Bei der Kombination beider Substanzen kam es hingegen nur zu einem geringen Anstieg der ROS-Produktion (Abb. 15).

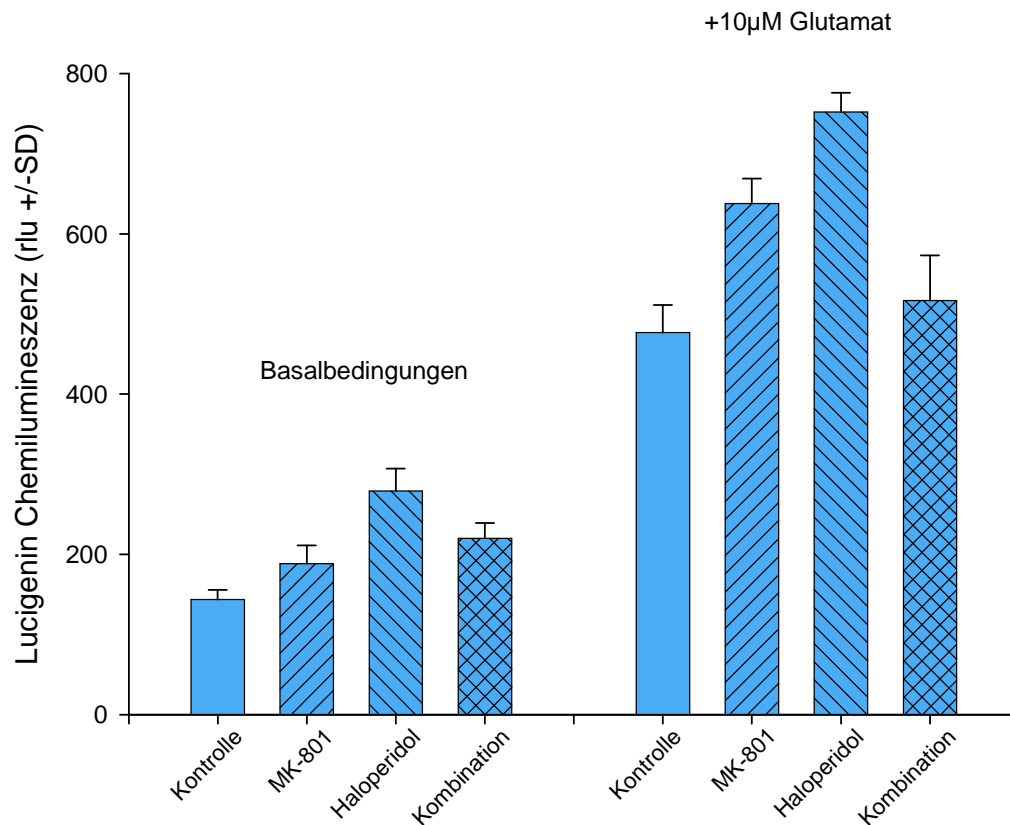


Abb. 15: Spontane und glutamatinduzierten ROS-Produktion in hippocampalen Zellen

Die Messung erfolgte nach Behandlung von MK-801 und Haloperidol mit Hilfe der $O_2^{\cdot -}$ sensitiven Lucigenin-Chemilumineszenz. Dieses Säulendiagramm wurde durch die Mittelung der Daten von zwei verschiedenen Zeitintervallen ($t_1=0-11$ min, $t_2=20-40$ min) erstellt. Für die Echtzeitmessung von Sauerstoffradikalen wurden hippocampale Zellen geerntet und mit Lucigenin beladen. Es wurde jeweils etwa 45 min abgewartet, bis ein stabiles Signalniveau in der Lucigenin Chemilumineszenz- Analyse registriert werden konnte. Nach 7 min wurde MK-801 und/oder Haloperidol und nach 12 min sowie nach 44 min Glutamat in den Zellüberstand gegeben und dabei jeweils der direkte Effekt auf die ROS-Produktion gemessen. Die Lichtemission wird dabei in „relative light units“ (rlu) wiedergegeben. Jede Säule stellt dabei den durchschnittlichen Lichtemissionswert von gleich behandelten Zellen in drei unterschiedlichen Experimenten dar.

5.1.5 Effekte von Haloperidol auf die zytotoxische Wirkung von MK-801

Mit steigenden MK-801-Konzentrationen in einem Dosisbereich bis 100 μM MK-801 kam es bei hippocampalen Neuronen zu einem starken Anstieg des LDH-Efflux, der den Verlust der Integrität der Plasmamembran widerspiegelt (Abb. 16a). Die Toxizität von höheren Dosen MK-801 ($>1 \mu\text{M}$) wurde bereits 2-4 Stunden nach Applikation deutlich und schritt während der gesamten Inkubationszeit immer weiter fort. Die LDH-Spiegel zeigten ab höheren Konzentrationen MK-801 (ab ca. 10 μM) eine Sättigungskinetik. Abbildung 16b zeigt, dass bereits ohne zusätzliche Behandlung mit MK-801 erhöhte LDH-Werte unter alleiniger Haloperidolbehandlung gemessen werden konnten. Nach Applikation steigender MK-801 Konzentrationen verstärkte Haloperidol die Zytotoxizität. Bei MK-801-Konzentrationen von 500 μM (hier nicht gezeigt) war sogar ein überadditiver Effekt von Haloperidol zu verzeichnen. In diesem Dosisbereich potenzierte Haloperidol die Toxizität von MK-801 um das Vierfache.

Insgesamt führte die Anwesenheit von Haloperidol bei der LDH-Messung zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für MK-801 von 0,242 AU (arbitrary units) auf 0,351 AU, während die halbmaximale effektive Dosis weitgehend unbeeinflusst blieb (0,04 μM vs. 0,092 μM) (vgl. Abb. 16a). Diese Reaktionsantwort zeigt eine Interferenz mit der NMDA-Rezeptor Antagonismus vermittelten Zytotoxizität über einen nichtkompetitiven (gemischten) inhibitorischen Mechanismus.

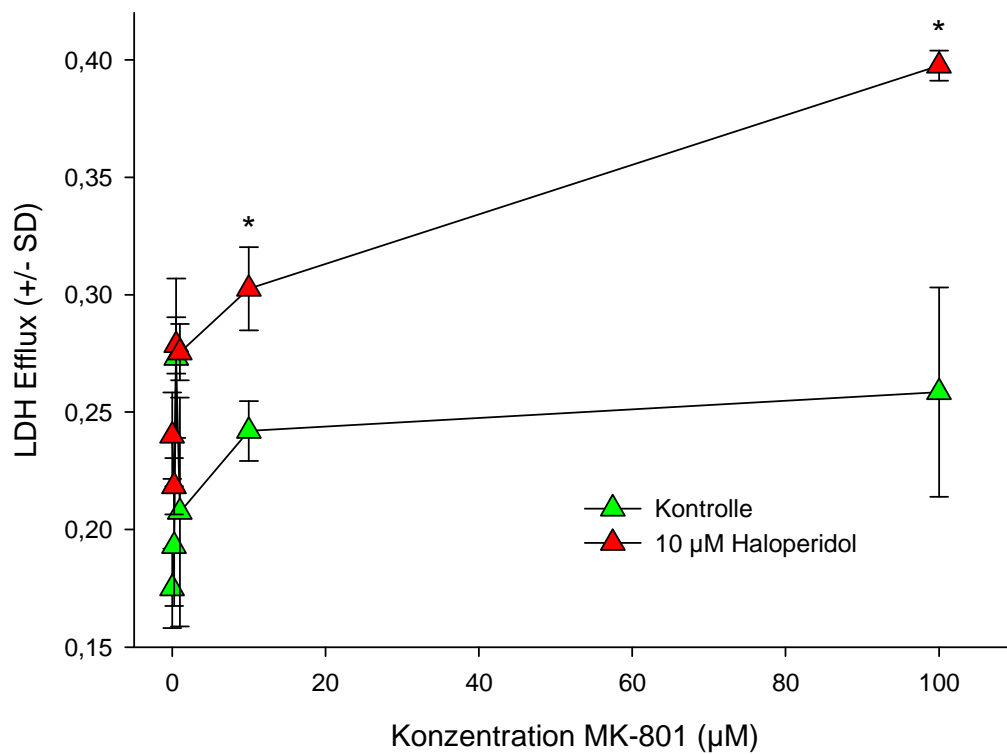


Abb. 16a: Effekte von Haloperidol auf die zytotoxische Wirkung von MK-801

Bei einer Gruppe hippocampaler Neurone erfolgte eine vierstündige Vorinkubation mit 5 µM Haloperidol, die Kontrollgruppe wurde unbehandelt belassen. Daraufhin wurden die Zellen weitere 20 h mit verschiedenen MK-801-Konzentrationen behandelt. Der nach 20 h gemessene LDH-Efflux in den Überstand stellt ein Maß für die Zytotoxizität dar. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert +/- SD von jeweils 6 verschiedenen individuellen Experimenten. * gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an ($p < 0,05$).

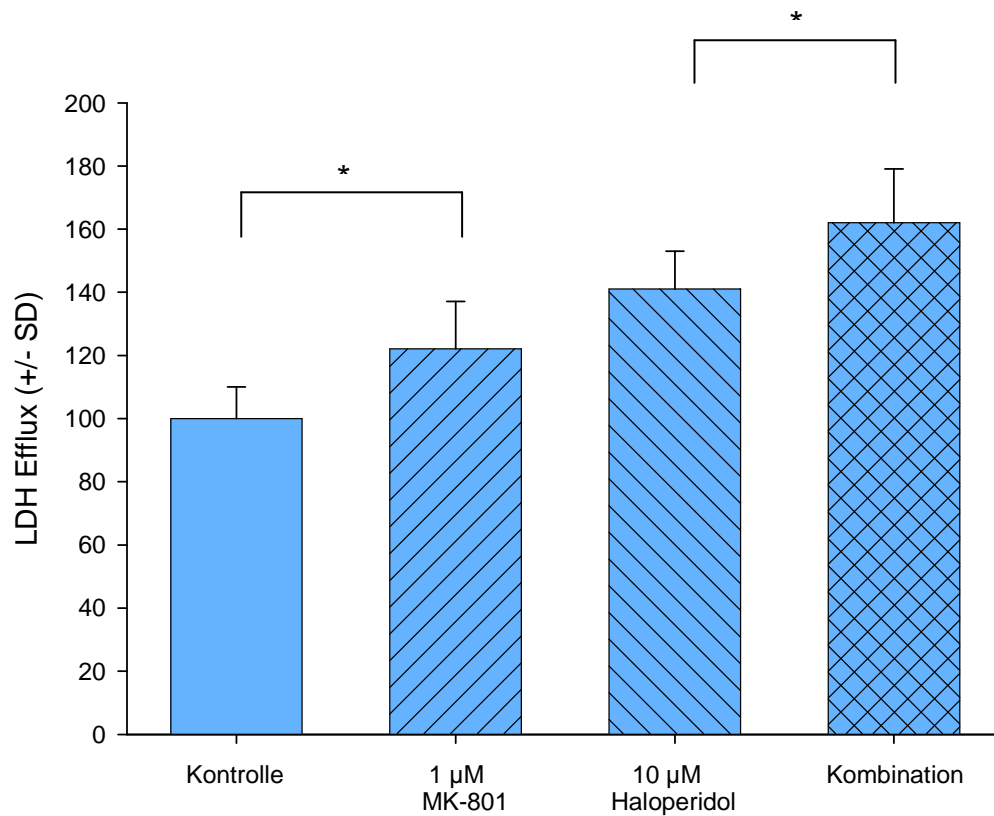


Abb. 16b: Effekte von Haloperidol auf die zytotoxische Wirkung von MK-801

Zur besseren Übersicht und Veranschaulichung der Wirkung von MK-801 (1 µM), Haloperidol und der Kombination beider Substanzen dient dieses Säulendiagramm, das nur einen Ausschnitt des in Abbildung 16a erklärten Versuchs darstellt. Die Daten stellen die Konzentration des in den Extrazellulärraum übergetretenen LDH dar und repräsentieren den Mittelwert +/- SD von jeweils 6 verschiedenen individuellen Experimenten. * gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an ($p < 0,05$).

5.1.6 Wirkung von Haloperidol auf den Glutamatspiegel unter der Behandlung mit MK-801

Neben der Messung der Zytotoxizität von MK-801 durch Quantifizierung des LDH-Efflux, wurden unter den gleichen Bedingungen die extrazellulären Glutamatspiegel gemessen. Ziel dabei war es, die Wirkung von MK-801 auf zellbiologischer Ebene genauer zu untersuchen.

Abbildung 17 zeigt die Messung der Glutamatkonzentrationen bei steigenden Konzentrationen von MK-801, mit und ohne Präinkubation mit Haloperidol. Steigende MK-801-Konzentrationen führten zu einem signifikanten Anstieg der extrazellulären Glutamatspiegel. Auch bei der Maximaldosis von 500 μ M MK-801 wurde keine Sättigung verzeichnet. Sowohl im hohen als auch im niedrigen Dosisbereich von MK-801 war kein signifikanter Unterschied zwischen der extrazellulären Glutamatkonzentration mit und ohne vorherige Inkubation mit Haloperidol sichtbar.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in Analogie zu unseren Beobachtungen im Tiermodell, Haloperidol die durch MK-801 induzierten Veränderungen im Glutamatmetabolismus nicht beeinflusste. LDH-Spiegel korrelieren somit nicht mit Glutamatspiegeln (Spearman`s Rho Korrelationskoeffizient 0,13; $p=0,42$) und zeigten im Gegensatz zu Letzteren eine Sättigungskinetik (vgl. Abb. 16a).

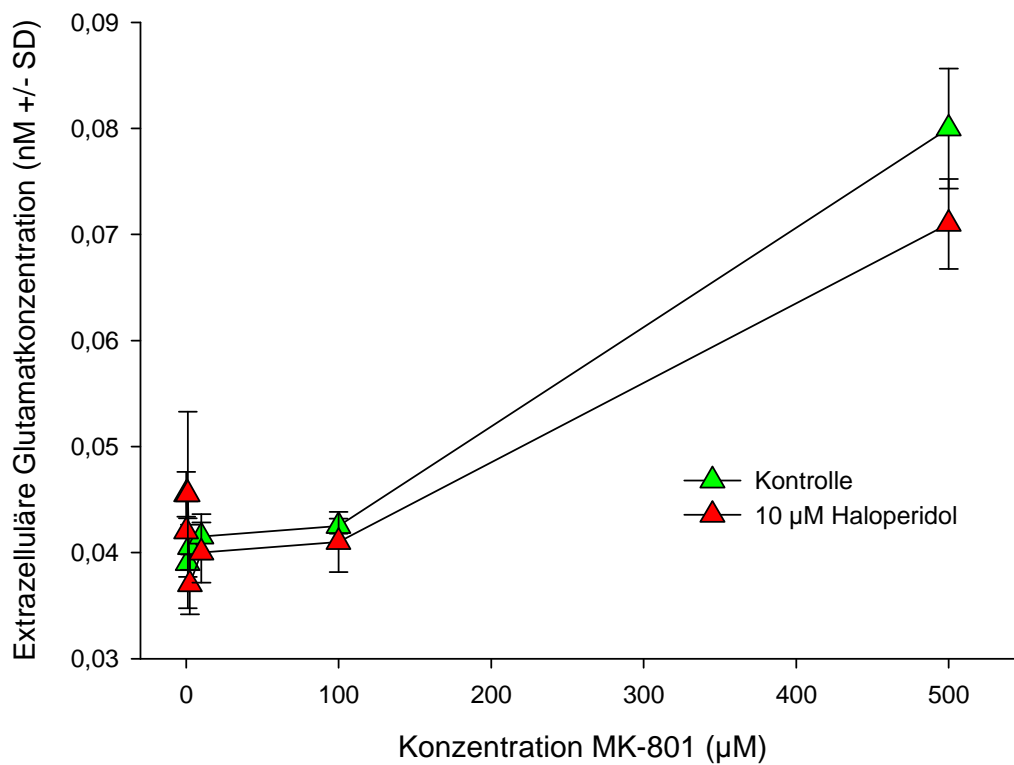


Abb. 17: Effekt von Haloperidol auf MK-801 induzierten Glutamatefflux.

Bei einer Gruppe hippocampaler Neurone erfolgte eine vierstündige Vorinkubation mit 5 μM Haloperidol, die Kontrollgruppe wurde unbehandelt belassen. Daraufhin wurden die Zellen weitere 20 h mit verschiedenen MK-801-Konzentrationen behandelt. Glutamat wurde anhand eines enzymatischen Tests im Zellkulturüberstand gemessen. repräsentieren den Mittelwert +/- SD von jeweils 6 verschiedenen individuellen Experimenten.

5.2 Neuroprotektive Eigenschaften von Kreatin in einem *in vitro* Modell der Neurodegeneration

5.2.1 Kein Anhalt auf Neurotoxizität von Kreatin nach Inkubation über einen längeren Zeitraum

Physiologische Kreatinkonzentrationen im ZNS liegen zwischen 10 und 30 μM . In unseren *in vitro* Experimenten konnten bei Konzentrationen bis zu 10 mM keine Zeichen von Neurotoxizität festgestellt werden, selbst bei einer Verlängerung der Inkubation von bis zu 5 Tagen. Dies konnte sowohl durch Quantifizierung von Membranschäden durch LDH-Messungen als auch durch mikroskopische Beurteilung der Zellintegrität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.2 Kein Anhalt auf antioxidative Eigenschaften von Kreatin im zellfreien Medium

In zellfreien Versuchen wurde anhand eines Systems aus Xanthinoxidase und Xanthin als einem enzymatischen Superoxidgenerator der direkte Einfluss von Kreatin auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies getestet. Kreatin zeigte bis in einen Dosisbereich von 5 mM keinerlei antioxidative Eigenschaften. Vielmehr konnten wir eine geringfügig *erhöhte* Chemilumineszenz unter Kreatinzugabe registrieren. Diese entspricht einer vermehrten Produktion oder aber einer erhöhten Halbwertszeit dieser Sauerstoffspezies.

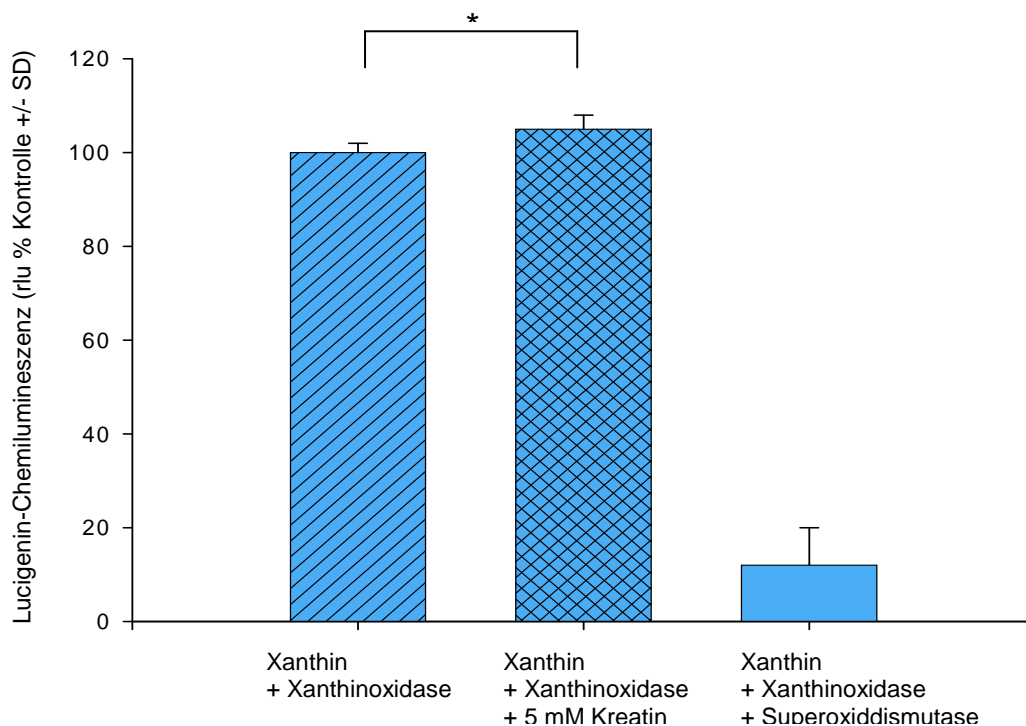


Abb. 18: Effekt von Kreatin auf die durch Xanthinoxidase-induzierte Produktion von ROS
Superoxidanionen wurden durch eine Kombination von Xanthin und Xanthinoxidase generiert, Die Lumineszenzentwicklung wurde nach Gabe von mit 5 mM Kreatin verfolgt. Die Positivkontrolle wurde mit SOD durchgeführt

5.2.3 Neuroprotektive Wirkung von Kreatin bei glutamatinduzierter Neurotoxizität in hippocampalen Neuronen

Hippocampale Zellen (DIV 17) wurden mit zwei unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (1,25 mM und 5 mM) mit und ohne Vorbehandlung mit 5 mM Kreatin inkubiert. Der LDH-Ausstrom aus den Zellen, als ein Marker für Zytotoxizität, zeigte unter Zugabe von Glutamat einen dosisabhängigen Anstieg. Gleichzeitig wurden morphologische Veränderungen der Zellen festgestellt: Es kam zu einem Rückzug von dendritischen und axonalen Fortsätzen sowie zu einem Loslösen der Zellen von den Zellkulturplatten. In Zellkulturen, die mit 5 mM Kreatin präinkubiert worden waren, kam es bei hohen Glutamatkonzentrationen von 5 mM zu einer signifikanten Abschwächung der glutamatvermittelten Toxizität. Interessanterweise zeigte sich keine signifikant erhöhte Zellvitalität der mit Kreatin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 19) sowohl unter Ausgangsverhältnissen (ohne Glutamat) als auch unter einer geringen Glutamatkonzentration (1,25 mM).

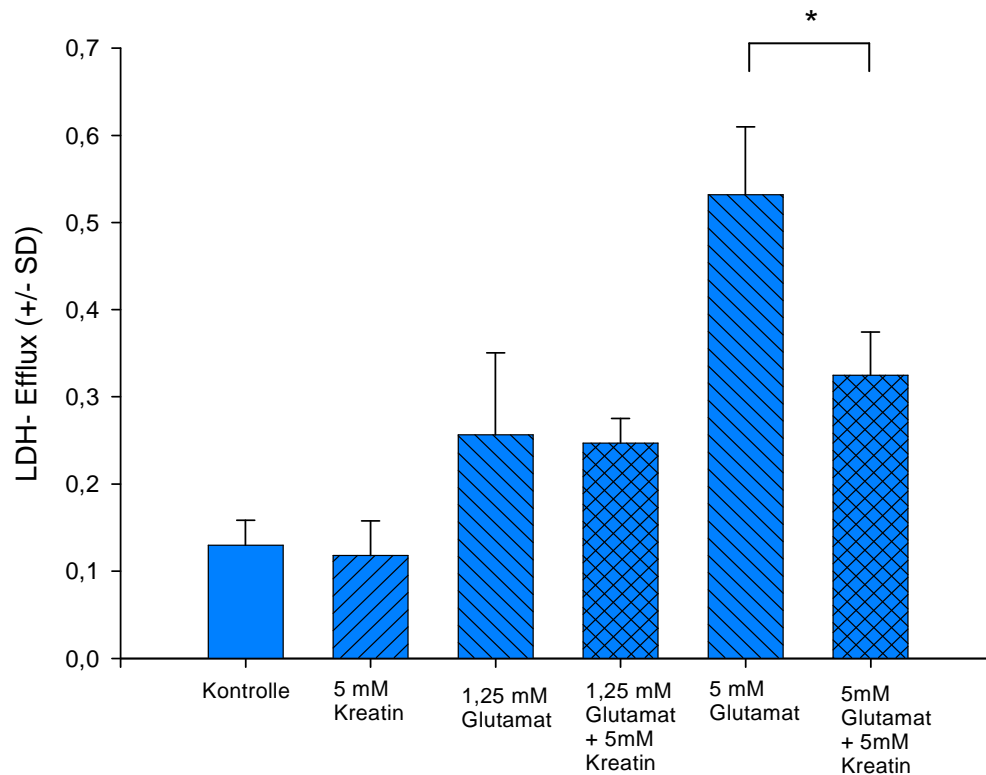


Abb. 19: Protektiver Effekt von Kreatin bei glutamatinduzierter Neurotoxizität

Hippocampale Zellen (DIV 17) wurden mit zwei unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (1,25 mM, 5 mM) behandelt, mit und ohne Vorinkubation mit Kreatin (5 mM). Nach 24 h wurde LDH-Konzentration im Überstand gemessen, die ein Maß für die Zytotoxizität darstellt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von jeweils 6 verschiedenen individuellen Experimenten.* gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den nicht mit Kreatin behandelten Zellen an ($p < 0,05$).

5.2.4 Wirkung von Kreatin auf den Energiegehalt von hippocampalen Nervenzellen unter glutamatinduzierter Neurotoxizität

Hippocampale Zellen (DIV 17) wurden mit einer Konzentration von 5 mM Glutamat inkubiert, mit und ohne 18-stündige Vorbehandlung mit 5 mM Kreatin. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre ATP-Konzentration wurde mit Hilfe der Luciferin/Luciferase Chemilumineszenz ermittelt.

Dabei erwiesen sich die intrazellulären ATP-Konzentrationen in hippocampalen Nervenzellkulturen, die 18 h mit Kreatin vorinkubiert worden waren, bei glutamatinduzierter Toxizität als um ein vielfaches erhöht gegenüber den ATP-Konzentrationen der unbehandelten Kontrollzellen.

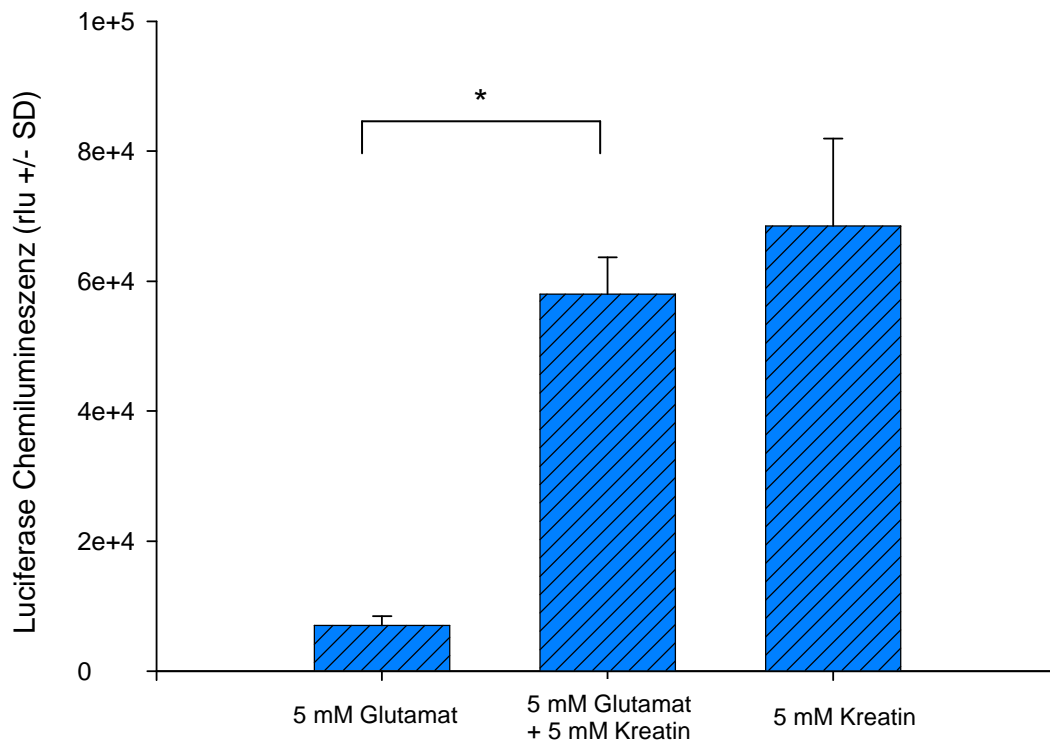


Abb. 20: Effekt von Kreatin auf die intrazelluläre ATP-Konzentration hippocampaler Neurone nach Glutamatexposition im toxischen Dosisbereich

Hippocampale Zellen (DIV 17) wurden mit 5 mM Glutamat behandelt, mit und ohne Vorinkubation mit Kreatin (5 mM). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre ATP-Konzentration mit Hilfe der Luciferase Chemilumineszenz ermittelt. Der totale Proteingehalt des Zelllysats diente als Referenz-Wert. Die Daten zeigen den intrazellulären ATP-Gehalt +/- SD. Jede Säule repräsentiert den Durchschnittswert von 6 unterschiedlichen Experimenten mit je n=3. * gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den nicht mit Kreatin behandelten Zellen an ($p < 0,05$).

5.2.5 Wirkung von Kreatin auf den Energiestoffwechsel von hippocampalen Zellen bei experimentell herbeigeführtem oxidativen Stress durch H₂O₂

Um oxidativen Stress zu induzieren, wurde dem Zellkulturüberstand Wasserstoffperoxid (H₂O₂) hinzugegeben. Unter Ausgangsbedingungen, also ohne Induktion von oxidativem Stress, waren die Energielevel bei mit Kreatin behandelten hippocampalen Zellen signifikant höher als bei den Kontrollzellen. Sobald die H₂O₂-Konzentration etwa 10 bis 20 µM überstieg, kam es nach 18 h Inkubation bei hippocampalen Zellen zu einem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentrationen, wobei sich oxidativer Stress stärker auf die ATP-Werte der mit Kreatin behandelten Zellen als auf die Kontrollzellen auswirkte: Mit steigenden H₂O₂-Konzentrationen fiel das Energielevel der mit Kreatin behandelten Zellen auf das der Kontrollzellen ab. Somit war ab einer Dosis von etwa 60 µM H₂O₂ kein Unterschied mehr bezüglich des Energielevels zwischen Kontroll- und Kreatinzellen ersichtlich (Abb. 21).

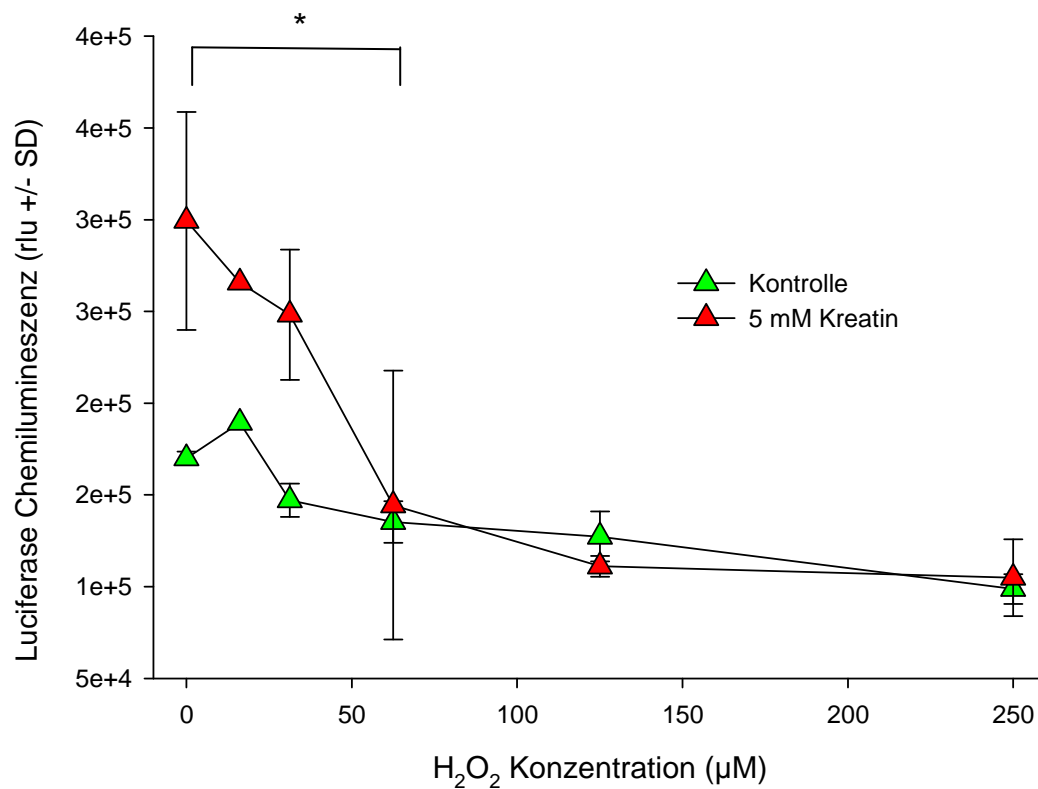


Abb. 21: Effekt von Kreatin auf den intrazellulären ATP-Gehalt in hippocampalen Zellen unter Einfluss von oxidativem Stress

Hippocampale Zellen (DIV 15) wurden mit steigenden Konzentrationen von H₂O₂ inkubiert, mit und ohne Vorinkubation mit 5 mM Kreatin. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre ATP-Konzentration mit Hilfe der Luciferase Chemilumineszenz ermittelt. Der totale Proteingehalt des Zelllysats diente als Referenz-Wert. Die Daten zeigen den intrazellulären ATP-Gehalt +/- SD. Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von 6 unterschiedlichen Experimenten mit je n=3. * gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den nicht mit Kreatin behandelten Zellen an (p< 0,05).

5.2.6 Fehlender direkter neuroprotektiver Effekt durch Kreatin nach Induktion von oxidativem Stress durch H_2O_2

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Wirkung von Kreatin auf die Zellvitalität unter H_2O_2 -induziertem oxidativen Stress untersucht werden. Dabei wurden hippocampale Zellen mit und ohne 18-stündige Vorinkubation mit 5 mM Kreatin ansteigenden H_2O_2 -Konzentrationen ausgesetzt. Wider Erwarten kam es zu einer signifikanten Erhöhung der H_2O_2 -induzierten Zytotoxizität unter Kreatinbehandlung (Abb. 22), obwohl ein erhöhter Energiegehalt der mit Kreatin behandelten Zellen bei Zugabe von niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 21).

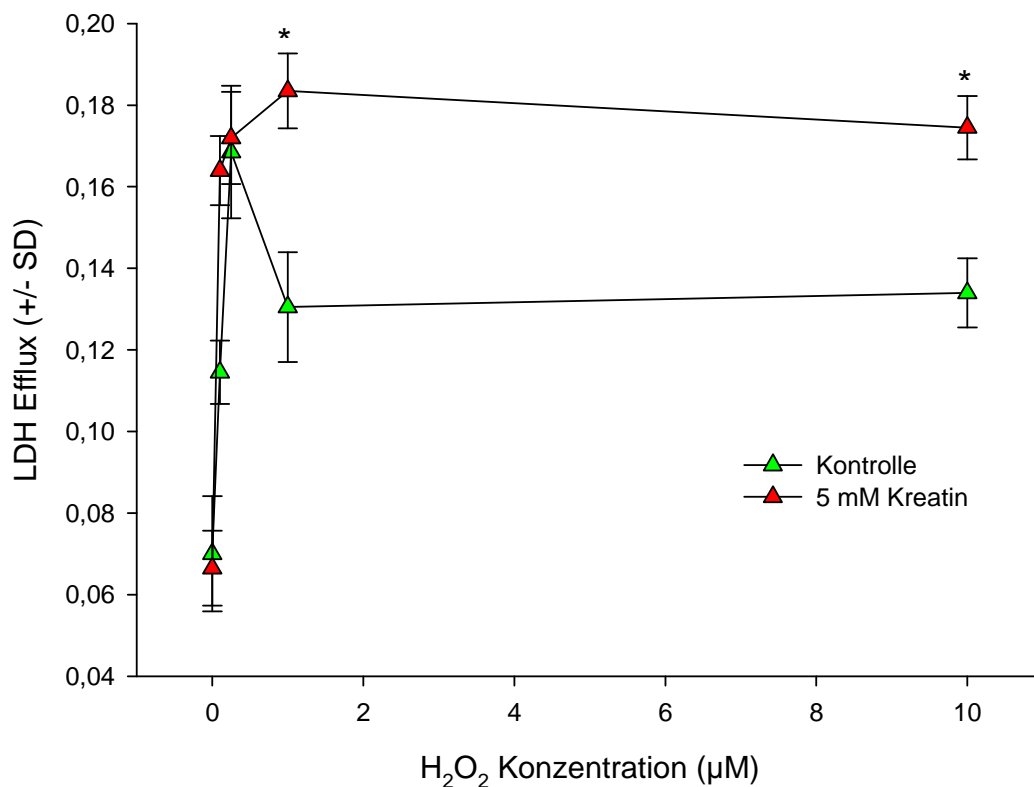


Abb. 22: Effekt von Kreatin auf Hippocampuszellen unter H_2O_2 -induziertem oxidativem Stress

Hippocampale Zellen (DIV 15) wurden mit steigenden Konzentrationen von H_2O_2 inkubiert, mit und ohne Vorinkubation mit 5 mM Kreatin (18 h).

Nach 24 h wurde der LDH-Efflux in den Überstand gemessen, der ein Maß für die Zytotoxizität darstellt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert +/- SD von jeweils 6 verschiedenen individuellen Experimenten.* gibt die statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an ($p < 0,05$).

5.2.7 Wirkung von Kreatin auf den Glutamatefflux hippocampaler Zellen bei experimentell herbeigeführtem oxidativen Stress durch H_2O_2

Kreatin, das in einer Konzentration von 5 mM 18 h vor H_2O_2 -Applikation in den Überstand hinzugegeben wurde, reduzierte bei hippocampalen Zellen den extrazellulären Glutamanstieg bei steigenden H_2O_2 -Konzentrationen, also bei erhöhtem oxidativen Stress (Abb. 23). Unter Baseline-Bedingungen, also ohne induzierten oxidativen Stress zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glutamatkonzentrationen bei mit Kreatin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Erst bei steigenden H_2O_2 -Werten unterbindet Kreatin den Glutamatefflux. Kreatin scheint somit effizient in diesen Circulus vitiosus einzugreifen, der die exzitotoxische Kaskade nach ihrer Aktivierung instand hält.

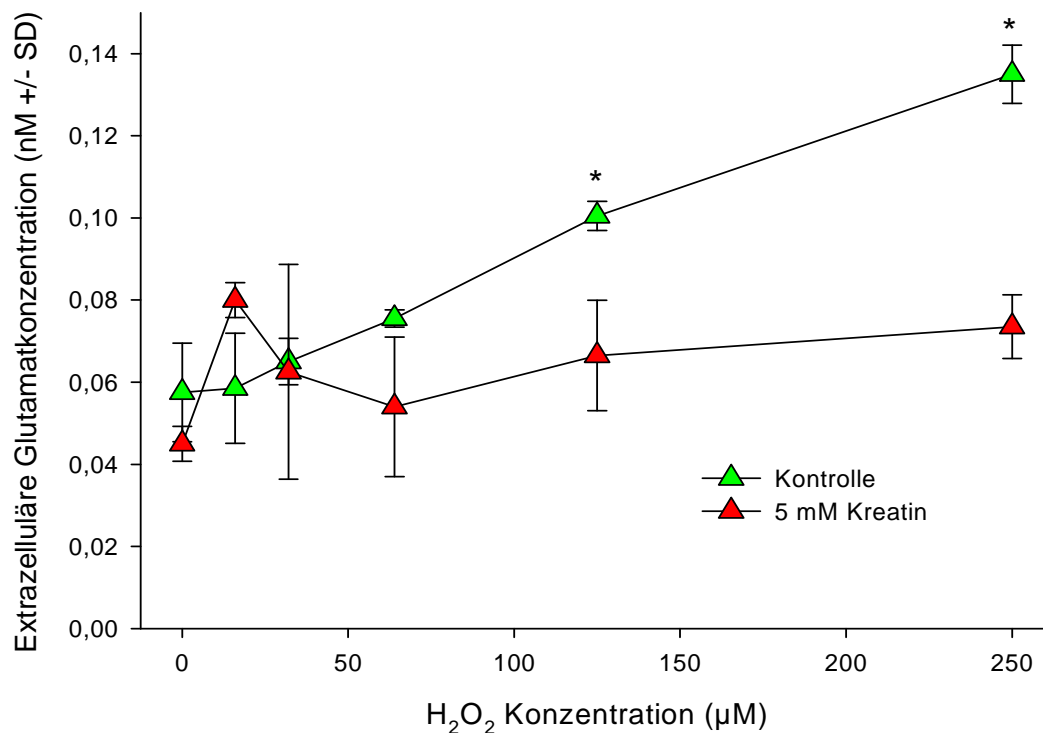


Abb. 23: Effekt von Kreatin auf den Glutamatefflux hippocampaler Zellen unter oxidativem Stress durch H_2O_2

Hippocampale Zellen (DIV 15) wurden mit steigenden Konzentrationen von H_2O_2 inkubiert, mit und ohne Vorinkubation mit 5 mM Kreatin. Glutamat wurde nach 24 h mit Hilfe eines enzymatischen Tests im Zellkulturüberstand gemessen. Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte +/- SD von 6 verschiedenen Experimenten. * zeigt die statistische Signifikanz gegenüber den unbehandelten Zellen an ($p < 0,05$).

5.2.8 Abschwächung des intrazellulären Kalziumanstiegs nach NMDA-Rezeptor-Stimulierung durch Kreatin

Es konnte festgestellt werden, dass über 18 h mit 5 mM Kreatin präinkubierte Zellen mit nachfolgendem Auswaschen der Substanz den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg nach NMDA-Rezeptor Stimulierung nahezu vollständig aufheben (Abb. 24):

Nach Gabe einer supramaximalen Dosis von 100 μM NMDA in Gegenwart von 10 μM Glyzin kam es bei den Kontrollzellen ausgehend von einer Ausgangskonzentration von 98 nM (+/-SD) zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration auf 155 nM (+/-SD). Bei mit Kreatin vorbehandelten Zellen blieb dieser Effekt aus; die Kalziumspiegel blieben dabei auf demselben Level wie vor der NMDA-Rezeptor-Aktivierung. Nach einigen Minuten wurde als Positivkontrolle 1 μM des SERCA (sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase)-Inhibitors Thapsigargin (500 nM) als Bolus hinzugegeben. Dieser entleert durch Interferenz mit Transportsystemen des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums die intrazellulären Kalziumspeicher und führt dergestalt zu einem Äquilibrium zwischen diesen Speichern und dem Zytoplasma.

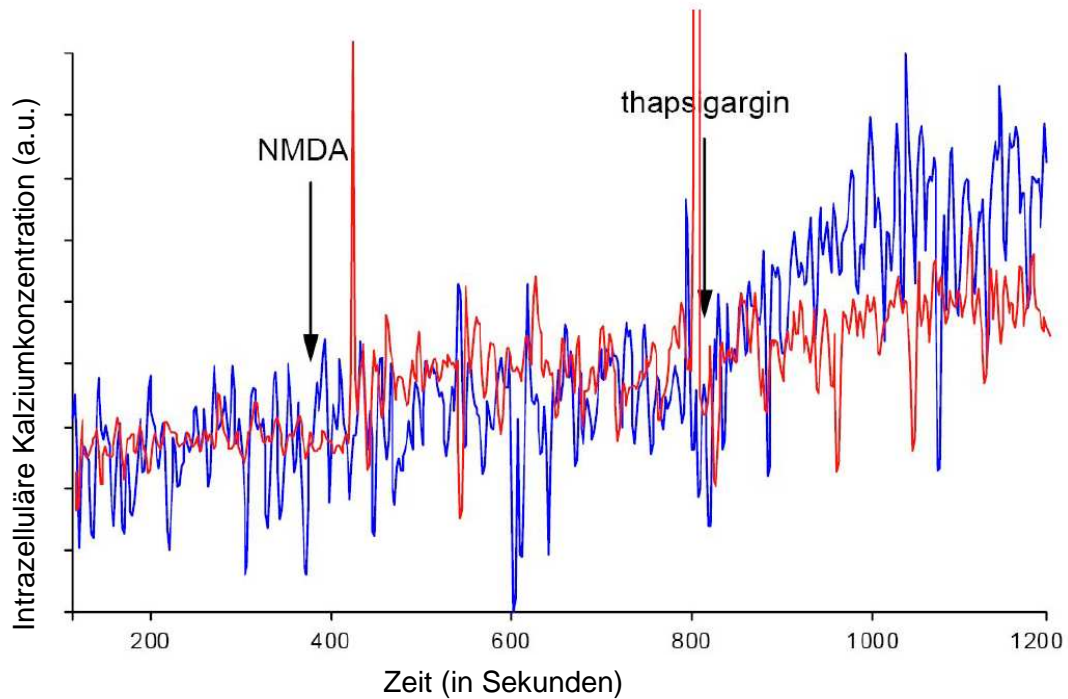


Abb. 24: Effekt von Kreatin auf den NMDA-induzierten intrazellulären Kalziumanstieg in hippocampalen Zellen (exemplarische Darstellung zweier Einzelableitungen)

Hippocampale Zellkulturen (DIV 18) wurden mit 5 mM Kreatin 18 h lang vorinkubiert, daraufhin geerntet, dissoziiert und mit FURA PE-3/AM beladen. Nachdem stabile Baseline Bedingungen erreicht wurden, wurde NMDA hinzugegeben und die Reaktion darauf wurde 400 Sekunden lang gemessen. Bei den mit Kreatin behandelten Zellen kam es zu einer Steigerung der Signalintensität um 7%, bei den Kontrollzellen zu einem Anstieg um 24%. Der SERCA Inhibitor Thapsigargin wurde hinzugefügt. Die Aufzeichnungen repräsentieren den Mittelwert aus 5 individuellen Experimenten. Die Daten für Kalzium sind in arbitrary units (au) aufgeführt. Die blaue Kurve zeigt die Reaktionen der mit Kreatin behandelten Zellen, die rote Kurve repräsentiert die Reaktion der Kontrollzellen.

6 Diskussion

6.1 Validität der Methodik - Beurteilung von *in vitro* Experimenten

Für biochemische Analysen erweisen sich Zellkulturmodelle als besonders günstig, insbesondere aufgrund ihrer gegenüber Geweben oder Organismen deutlich reduzierten biologischen Komplexität; dies ist insbesondere im Zusammenhang mit dem Kreatinmetabolismus hilfreich. Bei diesem ist die Interpretation von biochemischen Effekten aufgrund verschiedener systemischer Quellen und einer komplexen Pharmakokinetik zwischen verschiedenen Kompartimenten erschwert. Selbst bei einer intravenösen Applikation wäre es *in vivo* kaum möglich gewesen, kontrollierte Bedingungen mit Erreichen vorher definierter Konzentrationsbereiche zu etablieren. Um diese Unwägbarkeiten des *in vivo* Modells zu umgehen, haben wir uns für unsere Untersuchungen somit für ein System kultivierter embryonaler hippocampaler Neuronen entschieden. Immunhistochemische Färbungen für GFAP und NeuN konnten dokumentieren, dass über 99% aller Zellen in diesem Zellkultursystem neuronal differenziert waren. Somit dürfte ein signifikanter Beitrag glialer Zellen zu den hier gezeigten biochemischen Effekten äußerst unwahrscheinlich und alle Effekte auf das rein neuronale metabolische Verhalten zurückzuführen sein.

6.2 Glutamaterge Dysbalance und oxidativer Stress in einem *in vitro* Modell der Schizophrenie basierend auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801

Eine glutamaterge Dysbalance und der damit einhergehende oxidative Stress werden zunehmend als gemeinsame pathophysiologische Endstrecke einer Vielzahl von Erkrankungen, darunter ALS, Alzheimer Erkrankung, Chorea Huntington oder Morbus Parkinson diskutiert. Die Implikation dieser Pathomechanismen bei der Schizophrenie wird indessen noch kontrovers gesehen. Dabei stützt eine stetig wachsende Anzahl von Untersuchungen die Hypothese, dass es sich auch bei der Schizophrenie um eine organische Erkrankung auf der Basis eines neurodegenerativen Geschehens handeln könnte. Um die Rolle der glutamatergen Dysbalance in einem Modell der Schizophrenie auf zellbiologischer Ebene genauer zu verstehen, standen die Interaktion zwischen Glutamat und reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Wirkung von MK-801 auf den extrazellulären Glutamatspiegel, mit und ohne Applikation des Psychopharmakons Haloperidol, im Zentrum unserer Untersuchungen.

6.2.1 In vitro-Induktion von oxidativem Stress durch Glutamat

Die Aminosäure Glutamat stellt innerhalb des ZNS den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter dar. Sie ist an wichtigen Aufgaben wie Synaptogenese, Dendritenwachstum und Gedächtnisbildung beteiligt, sowie auch an neuronaler Proliferation und Apoptose. Liegt Glutamat jedoch in pathologisch erhöhten Konzentrationen vor, kann es im Sinne von Exzitotoxizität oxidativen Stress auslösen. Dies haben wir mit Hilfe der Lucigenin-Chemilumineszenz in hippocampalen Neuronen nachgeprüft, bei denen innerhalb weniger Millisekunden nach Glutamatapplikation ein rapider Anstieg der ROS-Konzentration zu registrieren war.

Um dieses Phänomen zu erklären, muss man rezeptorvermittelte sowie rezeptorunabhängige Signalwege beachten:

1. Der rezeptorvermittelte Signalweg erfolgt über die Bindung von Glutamat an ionotropen Glutamatrezeptoren, darunter auch am NMDA-Rezeptor, wodurch ein Einstrom von Kalzium- und Natriumionen induziert wird. Mit Hilfe der FURA-2/AM Ratiometrie konnte ein intrazellulärer Kalzium-Anstieg direkt nach der Applikation von Glutamat nachgewiesen werden. Durch den Entzug von intrazellulärem Kalzium durch den Kalziumchelator BAPTA/AM, kam es in unseren Versuchen zu einer vollständigen Antagonisierung des ROS-vermittelten Glutamateffluxes sowie zu einem Rückgang der Zytotoxizität. Der ROS-bedingte Glutamatanstieg sowie die ROS-bedingte Zytotoxizität scheinen somit über Kalzium vermittelt zu sein. Erklärt wird dies durch die Tatsache, dass der durch den starken Kalziumeinstrom resultierende zytoplasmatische Kalzium-Exzess negativ in die Regulation des Elektronentransportes der Mitochondrien eingreift und dadurch zu einer verminderten ATP-Produktion führt. Nach diesem Modell wird kompensatorisch der Elektronenfluss durch die Atmungskette verstärkt, wodurch gleichzeitig aber vermehrt Sauerstoffradikale und deren Derivate durch Shunts bzw. ineffizienten Elektronentransfer gebildet werden. Als weitere kompensatorische Leistung steigert die Zelle die Pumpleistung der Na^+/K^+ -ATPase, um dem vermehrten Einstrom von Na^+ -Ionen entgegenzuwirken. Da diese metabolische Umstellung mit einem gesteigerten ATP-Verbrauch einhergeht, muss dieser über einen zusätzlichen Elektronentransport kompensiert werden, was wiederum zu einer Erhöhung der ROS-Bildung führt.

Glutamat wird über verschiedene Transportmechanismen aus dem synaptischen Spalt entfernt. Bei einer stark erhöhten Glutamatkonzentration scheinen diese Mechanismen überlastet und damit nicht in der Lage zu sein, das Glutamat in ausreichendem Umfang zu entfernen. Zusätzlich steht nicht genügend ATP für die Umwandlung in andere Metabolite, wie etwa 2-Oxoglutarat oder Glutamin zur Verfügung. Bei einer Störung dieser enzymatischen Prozesse kann es bei zunächst normalen Glutamatwerten zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kommen. Dies wird genauer im Kapitel über die Neuroprotektion durch Kreatin behandelt.

2. Auch rezeptorunabhängige Mechanismen tragen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Glutamatexzess bei. Dabei spielt der Glutamat/Cystin-Antiporter, der im Normalzustand für den Transport von intrazellulärem Glutamat aus der Zelle im Austausch gegen extrazelluläres Cystin zuständig ist eine besondere Rolle (80). Intrazellulär erfolgt die Umwandlung von Cystin zu Cystein, welches zur Proteinsynthese und für die Bildung von Glutathion (GSH), einem bedeutenden Antioxidans, gebraucht wird. Bei einer extrazellulären Erhöhung der Glutamatkonzentration wird jedoch Cystin aus der Zelle hinaus transportiert. Somit kommt es zu einem verminderten Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies, da weniger Cystein zur Bildung von Glutathion hergestellt werden kann (80).

Der überaus starke Anstieg von Superoxidanionen in unseren Versuchen dürfte die Folge einer synergistischen Wirkung der rezeptorabhängigen und -unabhängigen Mechanismen sein, wobei angesichts der Zeitkonstante der rezeptorabhängige Weg wohl primär überwiegt. Die gesteigerte Produktion von ROS und deren verminderter Abbau führen zur Akkumulation von ROS im Nervensystem, also zu oxidativem Stress. Dieser kann schließlich zu Neurodegeneration durch Nekrose und Apoptose führen.

Neurales Gewebe erwies sich in einer Vielzahl von experimentellen Studien als besonders anfällig für oxidativen Stress. Dies kann durch den hohen Sauerstoffumsatz des Gehirns, seine besondere Lipidbeschaffenheit sowie durch den geringen Anteil an antioxidativen Schutzmechanismen erklärt werden. Der hohe Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren bietet einen idealen Angriffspunkt für Sauerstoffradikale und macht das neuronale Gewebe besonders anfällig für Oxidation (9,80). Im Gehirn finden sich zudem hohe Konzentrationen von enzymatisch aktiven Metall-Ionen,

namentlich Eisen- und Kupferionen. Diese spielen eine entscheidende katalytische Rolle bei der Vermittlung des toxischen Effekts und der Generierung von Hydroxylradikalen, im Rahmen der sog. Fenton-Reaktion (97). Die antioxidative Abwehr des Gehirns ist durch die niedrige Konzentration an der Glutathion-Peroxidase und nicht-enzymatischen Antioxidantien, wie zum Beispiel Vitamin E, vergleichsweise niedrig (6). Dies legt nahe, dass oxidativer Stress und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle in der Pathogenese unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen, darunter auch der Schizophrenie, spielen könnten. Um dies genauer zu untersuchen haben wir uns in weiteren Experimenten eines *in vitro* Modells der Schizophrenie bedient, basierend auf den NMDA-Antagonismus durch MK-801.

6.2.2 Wirkung von MK-801 auf den Glutamatspiegel: *In vitro* im Vergleich zu *in vivo* Untersuchungen

Unter Einsatz eines Tiermodells der Schizophrenie, das auf chronischer, niedrigdosierter Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 in einer vulnerablen Entwicklungsperiode basiert, konnten wir bereits im Vorfeld dieser Arbeit molekulare, zelluläre, funktionelle und verhaltensbiologische Anomalien dokumentieren, die die Theorie einer NMDA-Rezeptor-Hypofunktion bei der Schizophrenie stützen (15,25). In der vorliegenden Untersuchung erbringen wir weitere Beweise, dass dieses Modell einige bemerkenswerte, insbesondere metabolische Übereinstimmungen mit der genuinen Schizophrenie aufweist.

Zugrunde liegt die Hypothese, dass eine Disinhibition pyramidalen Zellen, hervorgerufen durch eine beeinträchtigte Kontrolle durch inhibitorische GABAerge Interneurone, letztlich in eine verstärkte Glutamatfreisetzung und damit in eine abnorm erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten mündet (vgl. Abb. 25).

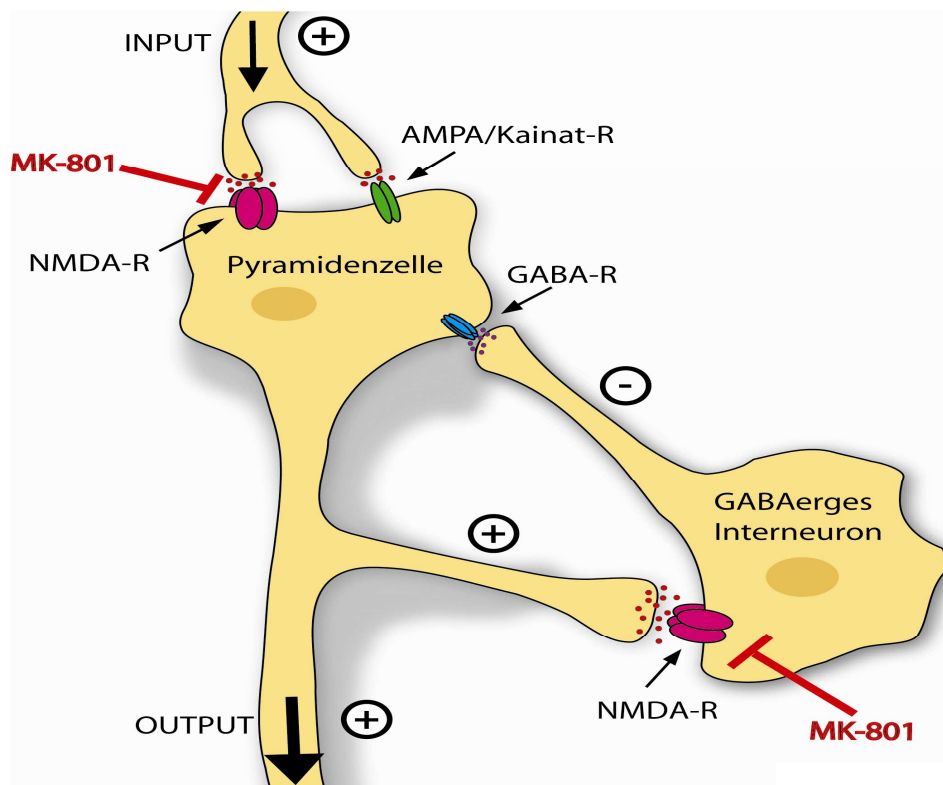


Abb. 25: Modell der neuronalen Disinhibition einer Pyramidenzelle durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801

Eine Pyramidenzelle erregt über NMDA-Rezeptoren ein GABAerges Interneuron. Von diesem erfolgt eine verstärkte rekurrente Hemmung der Pyramidenzelle. In Anwesenheit des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 wird diese Rückkopplungshemmung zum größten Teil aufgehoben. Der exzitatorische Input auf die Pyramidenzelle erfolgt neben NMDA-Rezeptoren auch über AMPA/Kainat-Rezeptoren, die nicht auf MK-801 reagieren. Aus diesem Grund kommt es unter MK-801 zu einem verstärkten exzitatorischen Output der Pyramidenzellen.

Die Wirkung von MK-801 auf den Glutaminspiegel wurde von unserer Arbeitsgruppe zunächst anhand des oben genannten Tiermodells untersucht, um dann die Experimente auf hippocampale Zellkulturen auszuweiten, was Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein soll.

Mit immunhistochemischen Verfahren ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, erhöhte intrazelluläre Glutaminspiegel in der Hippocampusformation nach chronischer Applikation von MK-801 zu dokumentieren (Publikation eingereicht). Im Bestreben darüber hinaus zu differenzieren, ob diese Phänomene lediglich Epiphänomene der Exzitotoxizität, oder aber eine spezifische Dysregulation des glutamatergen Systems darstellen, haben wir Untersuchungen auf der Ebene der Gentranskription durchgeführt: Sowohl der NMDA-Rezeptor C (Grin-2C) als auch das Protein Grip 1, ein mit dem Rezeptorkomplex assoziiertes regulatorisches Protein erwiesen sich als differenziell exprimiert und stellen somit potentielle Faktoren, die der Verschiebung

des Glutamatmetabolismus (oder aber der zellulären Antwort darauf) zugrunde liegen könnten. Die Vorstellung, dass eine veränderte Komposition oder Funktion des NMDA-Rezeptor-Komplexes einen Schlüsselfaktor bei der Pathogenese der Schizophrenie repräsentieren könnte, wird von vielen Studien geteilt (30-33).

Für *in vitro* Experimente wäre es wünschenswert, eine Schätzungsgrundlage für den im Gehirn erreichten Konzentrationsbereich von MK-801 nach chronischer intraperitonealer Applikation zu verfügen. Die uns bekannte Literatur enthält keine zuverlässigen pharmakokinetischen Informationen über die Pharmakokinetik von MK-801 bei Nagern. Aus diesem Grunde entschlossen wir uns experimentell einen weiten Konzentrationsbereich über mehrere Zehnerpotenzen abzudecken. Allerdings kann von Experimenten mit ^3H -gelabeltem MK-801, die gezeigt haben, dass eine einzige intraperitoneale Applikation von 0,2 mg/kg zu Hirnspiegeln von 428 nM führt (34), näherungsweise abgeleitet werden, dass eine wiederholte Applikation von 0,02 mg/KG zu Gehirngewebsspiegeln im hohen nanomolaren bzw. mikromolaren Bereich führen dürfte.

Im Rahmen unserer Zellkulturexperimente zeigte sich bereits bei mikromolaren MK-801-Konzentrationen ein merklicher Anstieg der Glutamatspiegel, der wider Erwarten nicht unmittelbar mit Zytotoxizität korrespondierte. Dies spricht eher für eine spezifische Dysregulation des Glutamatmetabolismus durch MK-801, als für unspezifische Toxizität. Der *in vitro* gemessene Glutamatanstieg weist eine gute Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien auf, die darstellen konnten, dass bei der Schizophrenie ein veränderter Glutamat/Glutamin-Quotient in *post mortem* Gehirn und Liquor cerebrospinalis vorliegt (23,24). Zudem haben *in vivo* Untersuchungen zur ^1H -Protonen Magnetresonanzspektroskopie zeigen können, dass eine Ketamingabe bei gesunden Freiwilligen die cinguläre Glutaminausschüttung vermehrt (35). Bei gesunden unbehandelten Individuen mit einem hohen individuellen genetischen Risiko an der Schizophrenie zu erkranken war dieser Marker ebenso erhöht (36).

6.2.3 Positiver Feedback-Kreislauf zwischen Glutamat und ROS unter MK-801

Interessanterweise führte der NMDA-Rezeptor-Antagonismus durch MK-801, einer Substanz der eigentlich neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen werden, zu einer Verstärkung des H_2O_2 induzierten Glutamatanstiegs. Man kann also davon sprechen, dass MK-801 die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 auf Hippocampusneurone potenziert und somit zu einem Glutamatanstieg führt, der über die bloße Summation der Einzeleffekte hinausgeht, im Sinne eines überadditiven Reaktionsmusters. Ein derartiges durch MK-801 induziertes Glutamatungleichgewicht im zellulären Mikromilieu könnte daher unmittelbar mit der vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert sein. Eine exzessive Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies repräsentiert einen Schlüsselmediator für das Auftreten von zellulärer Dysfunktion oder zellulärem Tod. Interessanterweise konnte bereits ein experimenteller Beweis für einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen einem Redoxungleichgewicht und der Entwicklung parvalbuminexprimierender Interneurone aufgezeigt werden. Dies ist ein Interneuronensubtyp, der sich in vielfach reproduzierten Studien, v.a. aber im Modell unserer Arbeitsgruppe (14), als numerisch reduziert bei der Schizophrenie erwiesen hat (38).

Während die Tatsache, dass eine Glutamatausschüttung die vermehrte Produktion von ROS begünstigt, ein gut bekanntes Phänomen darstellt, das wir auch in unseren Zellkulturexperimenten aufzeigen konnten, haben wir überdies dokumentieren können, dass ROS umgekehrt die Glutamatausschüttung in den Extrazellulärraum begünstigen. Aus diesem Grunde vermag MK-801 einen positiven Feedback-Kreislauf zu initiieren und aufrecht zu erhalten, der letztlich in Neurodegeneration resultieren könnte, unter Einbeziehung des ebenfalls rückgekoppelten Kalziumanstiegs.

Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen sind vielfältig: Es kann sich einerseits um eine unmittelbare Beeinträchtigung der präsynaptischen und astrozytären Glutamataufnahme durch den veränderten Redoxstatus der Zelle handeln (20). Zweifelsohne interessant ist aber andererseits auch die Anwesenheit von redoxsensitiven Domänen am NMDA-Rezeptor (18).

In der Studie von Steullet et al. zeigten Schizophreniepatienten eine Verringerung der Glutathionspiegel im Liquor und im präfrontalen Kortex, sowie eine Reduktion der Genexpression der Glutathion synthetisierenden Enzyme. Der durch das Glutathiondefizit induzierte oxidative Stress verändert die Plastizität und Ionenpermeabilität des NMDA-Rezeptors im Sinne einer Hypofunktion. Dieses Phänomen steht in direkter Verbindung mit einer exzessiven Oxidation der

extrazellulären redoxsensitiven Strukturen am NMDA-Rezeptor (98). Diese durch oxidativen Stress herabgesetzte Funktion des NMDA-Rezeptors kann wiederum zu einer Erhöhung der Glutamatspiegel führen, wie wir es bereits durch die NMDA-Rezeptor-Blockade mit MK-801 in unserem Zellkulturmodell zeigen konnten. Dies könnte eine weitere plausible Erklärung für den positiven Feedback-Kreislauf bieten, wie er durch die Gabe von MK-801 getriggert wird. Es kann einen Grund für erhöhte Glutamat- und ROS-Spiegel sowie die daraus resultierenden neurodegenerativen Phänomene in der Pathogenese der Schizophrenie darstellen.

Man muss beachten, dass der Interpretation von Zellkulturexperimenten gewisse Einschränkungen innewohnen, die vorrangig durch die Abwesenheit von Gliazellen bedingt sein dürften: Dem komplizierenden Zusammenspiel zwischen Neuronen und Astrozyten hinsichtlich des Glutamatmetabolismus wurde bislang in der Literatur noch nicht genug Aufmerksamkeit gezollt. Insbesondere der Glutamat/Glutaminzyklus, der einen unmittelbaren metabolischen Zusammenhang zwischen beiden Zellpopulationen herstellt und damit eine Homöostase zwischen extra- und intrazellulärem Glutamatspiegel aufrechterhält, sollte mehr Beachtung verdienen (104). In einem kürzlich publizierten Paper, das sich schwerpunktmäßig mit der glialen und neuronalen Interaktion befasst, konnten Kondziella et al. den Beweis für einen gestörten Glutamat/Glutaminzyklus erbringen (66), der möglicherweise auf dem inhibitorischen Effekt von MK-801 auf astrozytäre NMDA-Rezeptoren beruht (69). Letztlich resultiert dies in erhöhten Glutamatspiegeln. Überdies konnten eine gestörte glial-neuronale Interaktion und ein damit einhergehend beeinträchtigter Glutamat/Glutaminmetabolismus durch magnetresonanzspektroskopische Analysen im Temporallappengewebe von Ratten nachgewiesen werden, die eine chronische MK-801 Behandlung erhielten (37).

Da gliale Zellen lediglich unter 1% der Zellpopulation in unseren hippocampalen Zellkulturen repräsentieren, treffen diese komplizierenden Verhältnisse einer glial-neuronalen Interaktion lediglich auf die *in vivo* Experimente unserer Arbeitsgruppe zu und dürfen als weiteres Argument gewertet werden, dass es sinnvoll ist eine Strategie kombinierter *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zu verfolgen.

6.2.4 Wirkung von Haloperidol

Ein interessanter Aspekt unserer *in vitro* Versuche stellt die Potenzierung der MK-801 vermittelten Toxizität durch Haloperidol und die Diskrepanz zwischen Glutamat und LDH nach der Koadministration von Haloperidol dar.

Haloperidol zeigte in unseren Versuchen keinen Einfluss auf die durch MK-801 induzierten Veränderungen im Glutamatmetabolismus. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass der neurotoxische Effekt von Haloperidol nicht unmittelbar durch Effekte auf den Glutamatmetabolismus vermittelt wird. Desgleichen zeigt die schwache Korrelation zwischen LDH-Efflux und Glutamat, insbesondere im Hochdosisbereich an, dass Glutamatspiegel im Zellkulturüberstand nicht nur - wie in der Literatur oftmals behauptet - den Verlust der Zellmembranintegrität mit damit einhergehenden Glutamatausstrom in den Extrazellulärraum anzeigen und sich damit als Toxizitätsmarker eignen. Tatsächlich ist anzunehmen, dass der Glutamatausstrom durch einen bislang unbekannten Mechanismus auf prä- oder postsynaptischer Seite der glutamatergen Neurotransmission bedingt ist, ohne dass ein direkter Zusammenhang zur Zytotoxizität besteht.

Die Einordnung der Effekte von D₂-Rezeptorantagonisten auf die glutamatvermittelte Neurotransmission bleibt kontrovers:

1. Haloperidol weist eine signifikante Affinität zu NMDA-Rezeptoren auf und kann auf diesem Wege Rezeptormodifikationen verursachen, die eine Störung der glutamatergen Neurotransmission verstärken können, auch unabhängig von einem unmittelbaren Anstieg der Glutamatspiegel wie er etwa in verschiedenen Mikrodialyseexperimenten aufgezeigt werden konnte (79,86). So zeigen Ergebnisse, gewonnen an primären striatalen Kulturen, wie auch Tierversuche, dass Haloperidol einen cAMP vermittelten Signalweg initiiert, der letztlich zur Phosphorylierung der NR1 Untereinheiten des NMDA-Rezeptors führt (74).
2. Sogar die Anzahl von NMDA-Rezeptoren kann unter Haloperidolbehandlung in verschiedenen kortikalen Regionen steigen (68).
3. Abgesehen von der unmittelbaren Modulation der NMDA-Rezeptorfunktion besteht eine weitere Ebene der reziproken Interaktion zwischen glutamatergen und dopaminergen Transmittersystemen auf der Ebene der D₂/D₄-Rezeptor vermittelten Tyrosinkinasetransaktivierung, die eine Kaskade initiiert, die letztlich zur Unterdrückung von NMDA-Rezeptor mediierten Signalen führt (68).

Ein solcher Effekt könnte durchaus die Beeinträchtigung der glutamatergen Neurotransmission unter MK-801 verstärken.

4. Die neurotrophische Unterstützung der Neuronen repräsentiert ein weiteres Ziel des NMDA-Rezeptor-Antagonismus: In immunhistochemischen Versuchen konnte in unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass MK-801 die hippocampale Expression des Neurotrophins BDNF zu vermindern vermag (unpublizierte Daten). Dieser Effekt wird weiter verstärkt durch die Parallelinkubation mit D₂-Rezeptor-Antagonisten (42). Diese positive Interaktion bildet sich auch in EEG-Untersuchungen ab, die zeigen, dass eine mäßige EEG-Verlangsamung unter Haloperidol und MK-801, jeweils als Einzelgabe, massiv potenziert wird wenn beide Substanzen kombiniert werden (40). Dasselbe trifft im Übrigen auch auf das Phänomen der gestörten Prepulse-Inhibition zu, die Haloperidol nicht zu normalisieren vermag (39). Auch die frontokortikale metabolische Hypofunktion bei mit Phencyclidin behandelten Ratten wird durch Haloperidol nicht normalisiert (25).
5. Eine wachsende Zahl von Publikationen weist darauf hin, dass die kortikale und subkortikale Glutamatfreisetzung einer Modulation durch dopaminerge Schaltkreise unterliegt (29,71). Dieser Punkt kann jedoch bei *in vitro* Versuchen vernachlässigt werden.

Diese komplexen Zusammenhänge bedürfen sicherlich weiterer Untersuchungen, insbesondere in Hinblick darauf, dass die Besserung positiver und negativer Symptome durch Antipsychotika auf der Interaktion mit jeweils verschiedenen Rezeptorsystemen oder intrazellulären Signalwegen beruhen könnte. Obgleich die Veränderungen, die durch chronischen NMDA-Rezeptor-Antagonismus vermittelt sind, gewiss nicht die Schizophrenie als solche in ihrer ganzen Komplexität abbilden, gelang es uns doch, eine Anzahl Befunden vorzulegen, die zeigen, dass diese Strategie ein valides Modell, zumindest für einige der Kerndefizite bei dieser Erkrankung darstellt.

6.3 Kreatin als Neuroprotektivum in einem *in vitro* Modell der Neurodegeneration

Das neuroprotektive Potential von Kreatin wurde bereits in verschiedenen Modellen neurodegenerativer Erkrankungen untersucht, darunter auch in Tiermodellen, in denen durch Induktion von oxidativem Stress Pathomechanismen der Neurodegeneration nachempfunden wurden (1,78). Diese könnten auch bei der Schizophrenie eine Rolle spielen. In Anknüpfung an im Mausmodell erhobene Daten u.a. von Bender et al. in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe, in denen sich Kreatin als neuroprotektiv und lebensverlängernd erwiesen hat (12), wurden in der vorliegenden Arbeit eine Serie von komplementären *in vitro* Experimenten durchgeführt. Dabei wurden für die Pathogenese der Schizophrenie vermutlich relevante exzitotoxische Mechanismen durch die Gabe von Glutamat, H₂O₂ oder auch durch direkte NMDA-Rezeptor-Stimulierung nachgeahmt, um unter diesen Bedingungen die Wirkung von Kreatin auf die Zellvitalität, den Energiestoffwechsel sowie auf den Kalziumhaushalt der Neuronen näher zu untersuchen. Dies sollte es ermöglichen, einen besseren Einblick in die dem neuroprotektiven Effekt von Kreatin zugrunde liegende Pharmakodynamik zu gewinnen.

6.3.1 Kreatin als wichtiger Energielieferant des ZNS

In neuronalen Zellen stellt die aerobe Glykolyse in den Mitochondrien die primäre Quelle der ATP-Synthese dar (5). Durch *in vitro* Experimente konnten wir in dieser Arbeit nachweisen, dass Kreatin bereits unter Basalbedingungen, aber auch in Situationen von oxidativem Stress, in denen die Energieversorgung durch die Mitochondrien gestört ist, den Zellen Energie, letztlich in Form von ATP, liefert:

Mit Kreatin behandelte Zellen zeigten eine um ein Vielfaches höhere intrazelluläre ATP-Konzentration als die unbehandelten Kontrollzellen. Nach Induktion von oxidativem Stress durch H_2O_2 sank der Energiegehalt zwar in beiden Zellpopulationen etwa um das gleiche Maß ab. Durch die größere Energiereserve der mit Kreatin behandelten Zellen konnten sich diese trotzdem noch auf einem höheren Energieniveau halten als die unbehandelten Kontrollzellen.

Gerade in solchen exzitotoxischen Situationen könnte die Aktivität des Kreatin-Kinase/Phosphokreatin-Systems (CK/PCr) eine wichtige alternative Energiequelle zur aeroben Glykolyse in den Mitochondrien darstellen. Durch Phosphorylierung von Adenin ist das Kreatin/Kreatinkinasesystem fähig, ATP-Level innerhalb bestimmter Grenzen wieder aufzufüllen, abhängig von der Gewebekonzentration von Kreatin. Dies ist umso bedeutsamer, da Glukosespeicher, Glykogen und Sauerstoff im Gehirn im Vergleich zu anderen Organsystemen limitiert sind (52). Da man eine hohe relative CK-Aktivität im Gehirn nachweisen konnte (26,81,81,94), schreibt man diesem Enzym eine Schlüsselrolle im Energiestoffwechsel des ZNS zu: Die gehirnspezifische Isoform von CK (CK-BB) reguliert in Kooperation mit einer mitochondrialen Isoform (uMT-CK) und den benötigten Substraten (Kreatin/PCr) die ATP-Spiegel in Gehirnzellen bzw. subzellulären Kompartimenten (52).

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass unsere Daten, die einen beträchtlichen Anstieg des intrazellulären Energiestatus nach Kreatininubation zeigen, im Widerspruch mit vorliegenden Untersuchungen stehen, die einen Anstieg der Ratio von Phosphokreatin zu ATP, nicht aber einen direkten Anstieg von ATP-Spiegeln in hippocampalen Zellkulturen als einen der Neuroprotektion zugrunde liegenden Faktor zeigten (17).

6.3.2 Abnahme der glutamatinduzierten Neurotoxizität durch Anhebung des Energieniveaus durch Kreatin

In Hippocampuszellkulturen konnten wir nach Gabe von Kreatin eine signifikante Abnahme der glutamatinduzierten Neurotoxizität beobachten. Dabei wurden bei den mit Kreatin inkubierten Zellen höhere ATP-Level gemessen als bei den Kontrollzellen. Diese Ergebnisse sind durchaus vereinbar mit bereits publizierten Ergebnissen aus *in vitro* Versuchen mit Neuroblastomzellen, Hippocampuszellen oder gemischten zerebrokortikalen Zellkulturen: In all diesen Systemen konnte das Potential von Kreatin, die glutamatinduzierte Neurotoxizität abzuschwächen, gezeigt werden (17,58). Ein frühes Ereignis der Neurotoxizität von Glutamat stellt die Depletion hochenergetischer Phosphatverbindungen wie etwa ATP oder Phosphokreatin dar (8). Die dadurch bedingte tiefgreifende Beeinträchtigung der zellulären Energieproduktion hat letztlich eine Vielzahl von Folgen für die Zelle:

Durch einen Abfall von ATP im ZNS kann das Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten werden, da die nötige Energie für die Na^+/K^+ -ATPase sowie Ca^{2+} -ATPase fehlt (64). Als weiterer Mechanismus steht zur Diskussion, dass die CK-Aktivität über die Ausbildung eines CK „Energie-Shuttles“ direkt an der Neurotransmitterfreisetzung, der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und der Wiederherstellung von Ionengradienten über der Membran nach der Depolarisation beteiligt ist (33,47,52).

Die Energiedepletion führt auch zu einer reduzierten Konzentration von GTP (113) und damit einhergehend zu einer veränderten Aktivität GTP-bindender Proteine, wie etwa Rac oder Ras (108). Juravleva et al. haben die Hypothese aufgestellt, dass die Aufrechterhaltung der zellulären Energielevel durch Kreatin die apoptotische Balance in Richtung der antiapoptotischen PI3K/AKT bzw. „survival signal pathways“ (PI3K/Rac/ NAD(P)H-Oxidase/ROS/NF- κ B) verschiebt. Dies beruht auf der Stabilisierung der GTP-Level. Insbesondere betroffen davon ist das Ras/NF- κ B-System, in dem letztlich verschiedene zelluläre Pathways, die dem Survivalsystem zuzurechnen sind, konvergieren. Der Befund dieser Arbeit, dass Kreatin das Überleben von Neuronen unter Glutamatbehandlung förderte, korreliert in der Literatur mit sinkenden Spiegeln von farnesyliertem Ras und NF- κ B Inhibitor I κ B sowie *erhöhten* Konzentrationen von ROS (58), wobei letzteres zunächst paradox anmutet.

Diese Daten liefern einen Hinweis dafür, dass neben einem allgemeinen Auffüllen der Energiespeicher, Kreatin zum Teil noch unverstandene protektive Eigenschaften differentiell in Abhängigkeit zur Topographie, Biologie und dem Mikromilieu der verschiedenen neuronalen Zelltypen haben könnte. Dies ist umso bemerkenswerter im

Hinblick auf mögliche Therapien, da der Verlust von neuronalen Zellen essentiell in die Pathogenese der Schizophrenie involviert zu sein scheint: Bei dieser Erkrankung könnte Kreatin eine mögliche Ergänzung zu den konventionellen antipsychotischen Therapien, basierend auf Rezeptorantagonismus darstellen oder auch als eine präventive Maßnahme in Risikopopulationen Erfolg versprechen.

6.3.3 Fehlender direkter neuroprotektiver Effekt durch Kreatin nach Induktion von oxidativem Stress durch H₂O₂

Ein anderer kontrovers diskutierter Aspekt bleibt die antioxidative Eigenschaft von Kreatin. Dieser Fragestellung haben wir uns in der vorliegenden Arbeit gesondert angenommen. Gemeinhin wird postuliert, dass die Glutamattoxizität primär mit der exzessiven Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert ist. Der dabei entstehende oxidative Stress führt letztlich zur Veränderung von Makromolekülen und in der letzten Konsequenz zu Zytotoxizität. Recht kontrovers sind die verfügbaren Daten zum antioxidativen Verhalten von Kreatin. Während Lawler et al. Hinweise auf ein direktes antioxidatives Potential vorlegen konnten (73), gelang dies verschiedenen anderen Autoren nicht. Wider Erwarten konnten Juravleva et al. in Studien, die sich der „spintrapping EPR Spektroskopie“ bedienten, einem Goldstandard für die Identifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies, beträchtlich *verstärkte* EPR-Signalmuster für Superoxid nach Zugabe von Kreatin zu mit Glutamat behandelten kortikalen bzw. glialen Zellkulturen nachweisen (58). Auch unsere Versuche erbrachten keinen Hinweis auf ein direkt antioxidatives Potential von Kreatin: In zellfreien Versuchen, in denen wir ein System aus Xanthinoxidase und Xanthin als Superoxidgenerator genutzt haben, konnten wir diese Befunde von Juravleva et al. weitgehend replizieren. In unserem Versuch zeigte Kreatin bis in einen Dosisbereich von 5 mM keinerlei antioxidativen Eigenschaften. Vielmehr konnten wir eine geringfügig *erhöhte* Chemilumineszenz unter Kreatinzugabe registrieren. Diese entspricht einer vermehrten Produktion oder aber einer erhöhten Halbwertszeit von Superoxidanionen. Diese Beobachtungen korrespondieren gut mit einem weiteren Versuch, in dem wir feststellen konnten, dass H₂O₂ wider Erwarten in Gegenwart von Kreatin eine erhöhte Zytotoxizität entwickelte.

Paradoxerweise (und in Widerspruch zu unseren eigenen Daten) konnten die oben genannten Autoren unter diesen Bedingungen eine *verbesserte* Zellvitalität erreichen. Daraus wurde abgeleitet, dass die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies einen entscheidenden Faktor bei der Aktivierung von redoxabhängigen Survival Pathways darstellen könnte.

Tatsächlich legen aktuelle Daten einen differenzierteren Blick auf die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies in der Neurobiologie nahe und zwar dahingehend, dass oxidativer Stress nicht zwingend für die Zellvitalität und Funktion abträglich ist: Neben ihrer Eigenschaft als toxisches Wirkprinzip könnten reaktive Sauerstoffspezies zentrale regulatorische Signale in zellulären Survival Pathways repräsentieren (32).

Diese Aktivität wird über die Interaktion mit redoxabhängigen Transkriptionsfaktoren und damit die Induktion von ROS-sensitiven Genen vermittelt. Unter diesen Faktoren kommt insbesondere die Ras-Proteine und NFκB eine bedeutsame Rolle beim Zellwachstum, beim Überleben und der Differenzierung zu (22). Interessanterweise schien H_2O_2 in unseren Versuchen in äußerst geringen Konzentrationen (gemeint ist der niedrig mikromolare Bereich) die Überlebensfähigkeit der Hippocampuszellen zu verbessern, was die eben zitierten Studien stützt.

6.3.4 Abschwächung des intrazellulären Kalziumanstiegs durch Kreatin nach NMDA-Rezeptor-Stimulierung

An der glutamatergen Synapse scheinen Redoxmechanismen eine besonders große Rolle zu spielen. Nach Aktivierung des NMDA-Rezeptors mit nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom produzieren verschiedene postsynaptische Enzyme ROS, unter anderem die PGH-Synthase 2, NO-Synthase und zahlreiche mitochondriale Enzyme. PGH-Synthase ist im Kortex sowie im limbischen System weit verbreitet. NO-Synthase kommt vor allem in Axonen im Kortex und in GABAergen Interneuronen vor. Das Produkt der NO-Synthase Stickstoffmonoxid (NO) ist sowohl ein Vasodilatator als auch ein Neuromodulator, wobei es toxische Wirkung haben kann, wenn es im Hirnparenchym gebildet wird. Mit O_2^- reagiert es bereitwillig zu Peroxynitrit (ONOO^-), einem potenten, äußerst zelltoxisch wirkenden Oxidationsmittel. Nach dem heutigen Forschungsstand ist die Toxizität von Glutamat vor allem durch die NOS-vermittelte Produktion von ONOO^- verursacht. Nach Stimulation des NMDA-Rezeptors steigt die Produktion von freien Radikalen an, die dabei vorrangig in Mitochondrien lokalisiert zu sein scheint (13,93).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind die ersten, die einen direkten Beweis für eine Interferenz von Kreatin mit der Funktion der NMDA-Rezeptor-medierten Neurotransmission erbringen. Es gelang zu dokumentieren, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Kreatin zu beträchtlich reduzierten Kalziumantworten nach Stimulation mit NMDA führte. Dabei sollte noch einmal betont werden, dass diese Beobachtungen nach einer sorgfältigen Kreatin-Auswaschphase gemacht wurden. Aus diesem Grunde dürfen wir davon ausgehen, dass die Inkubation mit Kreatin zu nachhaltigen Veränderungen des NMDA-Rezeptor-Komplexes geführt haben dürfte.

6.3.5 Kreatinvermittelte Abschwächung des sekundären Glutamatexzesses bei oxidativem Stress

Überdies galt es aufzuklären, ob und inwieweit Kreatin mit dem Glutamatmetabolismus interferiert:

In dieser Arbeit konnte Kreatin nach Induktion von oxidativem Stress den sekundären dosisabhängigen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration nahezu vollständig antagonisieren.

In der Literatur wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass diese Effekte in erster Linie durch eine Unterstützung bzw. Stabilisierung des Glutamat-Glutamin-Zyklus mediert sein könnten. Dies ist ein System, das erstaunliche 60 bis 80% der Energie, die aus dem Glukosemetabolismus bezogen wird, verbraucht (91): Die Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt durch Gliazellen wird primär durch das Enzym GLT-1 (glutamate transporter 1) vermittelt (60). Auch die Glutaminsynthese und Glutaminase sind ATP-abhängig. Diese sind beteiligt am Glutamintransport in das präsynaptische Neuron oder an der Oxidation zu 2-Oxoglutarat, das letztlich den Zitratzyklus erreicht (10,36,112). Im Tiermodell konnte unter Kreatinsupplementierung in der differentiellen Genexpressionsanalyse eine nahezu um den Faktor 2 erhöhte Expression des „glial high affinity glutamate transporters“ Slc1a3 identifiziert werden. Dies lässt eine beschleunigte Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt erwarten (11).

Interessanterweise waren, wie bereits oben erwähnt, gliale Zellen praktisch nicht in unserem Zellkulturmodell vorhanden. Trotzdem konnten wir nicht nur einen unmittelbaren Beweis für eine massive Verbesserung der Versorgung mit ATP-gebundener Energie in isolierten hippocampalen Zellen vorlegen, sondern darüber hinaus zeigen, dass auch ungeachtet der Abwesenheit von Gliazellen, der extrazelluläre Glutamat „spillover“ wirksam antagonisiert wird. Es darf also postuliert werden, dass unter Kreatinsupplementierung bereits die Glutamatausschüttung in den Extrazellulärraum limitiert wird. Nicht verwunderlich war, dass die Zellen weitaus resistenter gegenüber exzitotoxischen Bedingungen (Glutamatbehandlung) waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kreatin bei glutamatinduzierter Zytotoxizität in viererlei Hinsicht neuroprotektiv zu wirken scheint:

- 1) Zunächst vermittelt Kreatin bei oxidativem Stress eine Abschwächung des Glutamatefflux. Die dadurch erniedrigten extrazellulären Glutamat-Konzentrationen haben eine niedrigere Zytotoxizität zur Folge.
- 2) Die potentiell zytotoxische Wirkung von bereits bestehenden Glutamat-Leveln wird von Kreatin abgeschwächt, wahrscheinlich mediiert über eine Anhebung des intrazellulären Energiestatus.
- 3) Kreatin moduliert darüber hinaus die Empfindlichkeit von NMDA-Rezeptoren.
- 4) *In vivo* tritt letztlich noch die möglicherweise verbesserte Elimination von Glutamat aus dem Extrazellulärraum durch gliale Shuttlesystem hinzu.

6.3.6 Kreatin als Supplementierungstherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen

Wenn auch nicht bei der Schizophrenie selbst, konnte doch in einer klinischen Pilotstudie zur Chorea Huntington, einer weiteren Krankheit, die mit der Exzitotoxizität von Glutamat in Verbindung gebracht wird und damit Parallelen zur Schizophrenie aufweist (11), analog zu den *in vitro* Ergebnissen ein direkter Einfluss von Kreatin auf den Glutamatmetabolismus nachgewiesen werden: Dabei handelte es sich um die diätetischen Supplementierung von Kreatin bei Chorea Huntington-Patienten. Günstig erweisen sich hierbei die steigenden intrazellulären Energielevel nach Kreatingabe, wie sie auch in den Zellkulturexperimenten dieser Arbeit demonstriert werden konnten. Bedauerlicherweise gelang es im Unterschied zu Tiermodellen der Chorea Huntington (7,41,96) in klinischen Versuchen nicht, auch durch hochdosierte Supplementierung mit Kreatin irgendeinen messbaren klinischen Benefit zu erreichen (11); Dies dürfte auf eine zu geringe Dauer der jeweiligen Supplementierungsperiode zurückzuführen sein. Entsprechende längerfristig angelegte Untersuchungen, nicht zuletzt auch im Sinne von neuroprotektiven Add-on Therapien bei der Schizophrenie wurden vor Kurzem durchgeführt, zeigten aber keine Auswirkungen auf kognitive Funktionen sowie Positiv- und Negativsymptome schizophrener Patienten (61). Da dieses pharmakologische Prinzip aber prinzipiell äußerst vielversprechend erscheint, werden derzeit weitere, großangelegte Supplementierungsstudien bei der Schizophrenie durchgeführt.

7 Zusammenfassung

Eine glutamaterge Dysbalance und der damit einhergehende oxidative Stress stellen einen möglichen Pathomechanismus der Schizophrenie auf der Basis eines neurodegenerativen Geschehens dar. Die Gültigkeit dieser Hypothese sowie neuroprotektive Strategien wurden im Rahmen dieser Arbeit auf zellbiologischer Ebene in einem *in vitro* Modell der Schizophrenie, basierend auf dem NMDA-Rezeptor-Antagonismus mit MK-801, genauer untersucht. Im Zentrum dieser Untersuchungen stand dabei die Interaktion zwischen Glutamat und reaktiven Sauerstoffspezies, sowie die Wirkung von MK-801 auf den extrazellulären Glutamatspiegel, die Rolle von Kalzium und die Modulation dieser Effekte durch den D₂-Antagonisten Haloperidol. Des Weiteren wurde Kreatin als potentiell neuroprotektives Pharmakon bei H₂O₂- und glutamatinduziertem oxidativen Stress, sowie seine direkte Wirkung auf den NMDA-Rezeptor-medierten Kalziumanstieg genauer untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass die Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK-801 zu ansteigenden extrazellulären Glutamatkonzentrationen führt, die wiederum über einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer verstärkten ROS-Produktion führen. Da ROS-Konzentrationen über einen Kalziumanstieg einen Glutamatefflux triggern, kann von einem positiven Feedbackkreislauf ausgegangen werden, der durch den NMDA-Antagonismus mit MK-801 verstärkt, wenn nicht sogar initiiert werden kann. Der dadurch verstärkte oxidative Stress kann schließlich zu neurodegenerativen Phänomenen führen. Da sich Kreatin in Tiermodellen bei oxidativem Stress neuroprotektiv und lebensverlängernd ausgewirkt hat, könnte es auch als potentielles Antioxidanz einen neuroprotektiven Ansatz bei der Schizophrenie darstellen. Tatsächlich konnte durch Kreatin eine Abschwächung des durch oxidativen Stress induzierten Glutamatefflux bewirkt werden. Auch glutamatinduzierte Neurotoxizität wird durch Kreatin abgeschwächt, wahrscheinlich mediert über eine Anhebung des intrazellulären Energiestatus und/oder aber auch durch die nachgewiesene Modulation der Empfindlichkeit von NMDA-Rezeptoren.

8 Literaturverzeichnis

1. Adcock KH, Nedelcu J, Loenneker T, Martin E, Wallimann T, Wagner BP. Neuroprotection of creatine supplementation in neonatal rats with transient cerebral hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 24: 382-8, 2002.
2. Adler LA, Peselow E, Duncan E, Rosenthal M, Angrist B. Vitamin E in tardive dyskinesia: time course of effect after placebo substitution. *Psychopharmacol Bull* 29: 371-4, 1993.
3. Adler LA, Peselow E, Rotrosen J, Duncan E, Lee M, Rosenthal M, Angrist B. Vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 150: 1405-7, 1993.
4. Amaral D.G., Witter M.P. Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System*. Academic Press, p. 443-493, 1995.
5. Ames A, III. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34: 42-68, 2000.
6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-22, 1993.
7. Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Jenkins BG, Ferrante KL, Thomas M, Friedlich A, Browne SE, Schilling G, Borchelt DR, Hersch SM, Ross CA, Beal MF. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8: 479-91, 2001.
8. Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366: 211-23, 1998.
9. Behl C, Holsboer F. [Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 66: 113-21, 1998.
10. Bellocchio EE, Reimer RJ, Freneau RT, Jr., Edwards RH. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289: 957-60, 2000.
11. Bender A, Auer DP, Merl T, Reilmann R, Saemann P, Yassouridis A, Bender J, Weindl A, Dose M, Gasser T, Klopstock T. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. *J Neurol* 252: 36-41, 2005.
12. Bender A, Beckers J, Schneider I, Holter SM, Haack T, Ruthsatz T, Vogt-Weisenhorn DM, Becker L, Genius J, Rujescu D, Irmeler M, Mijalski T, Mader M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Wurst W, Schmidt J, Klopstock T. Creatine improves health and survival of mice. *Neurobiol Aging* 2007.
13. Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16: 1324-36, 1996.

14. Braun I, Genius J, Grunze H, Bender A, Moller HJ, Rujescu D. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr Res* 97: 254-63, 2007.
15. Brdiczka D, Beutner G, Ruck A, Dolder M, Wallimann T. The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors* 8: 235-42, 1998.
16. Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de BA, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2569-74, 1997.
17. Brewer GJ, Wallimann TW. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 74: 1968-78, 2000.
18. Brimecombe JC, Potthoff WK, Aizenman E. A critical role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit (NR) 2A in the expression of redox sensitivity of NR1/NR2A recombinant NMDA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 785-92, 1999.
19. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180: 248-57, 1977.
20. Campisi A, Caccamo D, Li VG, Curro M, Parisi G, Avola R, Vanella A, Ientile R. Glutamate-evoked redox state alterations are involved in tissue transglutaminase upregulation in primary astrocyte cultures. *FEBS Lett* 578: 80-4, 2004.
21. Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 13: 272-6, 1990.
22. Castagne V, Gautschi M, Lefevre K, Posada A, Clarke PG. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* 59: 397-423, 1999.
23. Chan AS, Kwok IC, Chiu H, Lam L, Pang A, Chow LY. Memory and organizational strategies in chronic and acute schizophrenic patients. *Schizophr Res* 41: 431-45, 2000.
24. Chen L, Roberts R, Friedman DL. Expression of brain-type creatine kinase and ubiquitous mitochondrial creatine kinase in the fetal rat brain: evidence for a nuclear energy shuttle. *J Comp Neurol* 363: 389-401, 1995.
25. Cochran SM, Kennedy M, McKerchar CE, Steward LJ, Pratt JA, Morris BJ. Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28: 265-75, 2003.

26. Corbett RJ, Laptook AR. Age-related changes in swine brain creatine kinase-catalyzed ^{31}P exchange measured in vivo using ^{31}P NMR magnetization transfer. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 1070-7, 1994.
27. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-95, 1993.
28. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160: 81-8, 1993.
29. de BA, Fiore G, Iasevoli F. Dopamine-glutamate interaction and antipsychotics mechanism of action: implication for new pharmacological strategies in psychosis. *Curr Pharm Des* 11: 3561-94, 2005.
30. Dechent P, Pouwels PJ, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* 277: R698-R704, 1999.
31. Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8: 1454-68, 1988.
32. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
33. Dunant Y. Acetylcholine release in rapid synapses: two fast partners--mediatophore and vesicular $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport. *J Mol Neurosci* 30: 209-14, 2006.
34. Egerton A, Reid L, McGregor S, Cochran SM, Morris BJ, Pratt JA. Subchronic and chronic PCP treatment produces temporally distinct deficits in attentional set shifting and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 198: 37-49, 2008.
35. Ellison G. The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 250-67, 1995.
36. Erecinska M, Zaleska MM, Nissim I, Nelson D, Dagani F, Yudkoff M. Glucose and synaptosomal glutamate metabolism: studies with $[^{15}\text{N}]\text{glutamate}$. *J Neurochem* 51: 892-902, 1988.
37. Eyjolfsson EM, Brenner E, Kondziella D, Sonnewald U. Repeated injection of MK801: an animal model of schizophrenia? *Neurochem Int* 48: 541-6, 2006.
38. Falkai P, Honer WG, Alfter D, Schneider-Axmann T, Bussfeld P, Cordes J, Blank B, Schonell H, Steinmetz H, Maier W, Tepest R. The temporal lobe in schizophrenia from uni- and multiply affected families. *Neurosci Lett* 325: 25-8, 2002.
39. Feifel D, Priebe K. The effects of subchronic haloperidol on intact and dizocilpine-disrupted sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl)* 146: 175-9, 1999.

40. Feinberg I, Campbell IG. Haloperidol potentiates the EEG slowing of MK-801 despite blocking its motor effects: implications for the PCP model of schizophrenia. *Neuroreport* 9: 2189-93, 1998.
41. Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 20: 4389-97, 2000.
42. Fumagalli F, Molteni R, Roceri M, Bedogni F, Santero R, Fossati C, Gennarelli M, Racagni G, Riva MA. Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity. *J Neurosci Res* 72: 622-8, 2003.
43. Gao XM, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157: 1141-9, 2000.
44. Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 446-53, 1998.
45. Glantz LA, Lewis DA. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57: 65-73, 2000.
46. Grace AA. The depolarization block hypothesis of neuroleptic action: implications for the etiology and treatment of schizophrenia. *J Neural Transm Suppl* 36: 91-131, 1992.
47. Guerrero ML, Beron J, Spindler B, Groscurth P, Wallimann T, Verrey F. Metabolic support of Na⁺ pump in apically permeabilized A6 kidney cell epithelia: role of creatine kinase. *Am J Physiol* 272: C697-C706, 1997.
48. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* 97: 209-13, 1987.
49. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-65, 1994.
50. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford University Press, 1989.
51. Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361: 417-9, 2003.
52. Hemmer W, Wallimann T. Functional aspects of creatine kinase in brain. *Dev Neurosci* 15: 249-60, 1993.
53. Holtzman D, Togliatti A, Khait I, Jensen F. Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr Res* 44: 410-4, 1998.

54. Ipsiroglu OS, Stromberger C, Ilas J, Hoyer H, Muhl A, Stockler-Ipsiroglu S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. *Life Sci* 69: 1805-15, 2001.
55. Javitt DC. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J Clin Psychiatry* 9: 12-35, 1987.
56. Javitt DC. Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions. *Int Rev Neurobiol* 78: 69-108, 2007.
57. Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201-25, 1999.
58. Juravleva E, Barbakadze T, Mikeladze D, Kekelidze T. Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glial cells, modulates Ras/NF-kappaB signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 79: 224-30, 2005.
59. Kaldis P, Hemmer W, Zanolza E, Holtzman D, Wallimann T. 'Hot spots' of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. *Dev Neurosci* 18: 542-54, 1996.
60. Kanner BI, Schuldiner S. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 1-38, 1987.
61. Kapsan A, Odessky A, Osher Y, Levine J. Lack of efficacy of 5 grams daily of creatine in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry* 68: 881-4, 2007.
62. Kendler KS, Gardner CO. The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Med* 27: 411-9, 1997.
63. Keshavan MS, Mallinger AG, Pettegrew JW, Dippold C. Erythrocyte membrane phospholipids in psychotic patients. *Psychiatry Res* 49: 89-95, 1993.
64. Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5: 347-50, 1999.
65. Kohl F. [The beginning of Emil Kraepelin's classification of psychoses. A historical-methodological reflection on the occasion of the 100th anniversary of his "Heidelberg Address" 27 November 1898 on "nosologic dichotomy" of endogenous psychoses]. *Psychiatr Prax* 26: 105-11, 1999.
66. Kondziella D, Brenner E, Eyjolfsson EM, Markinhuhta KR, Carlsson ML, Sonnewald U. Glial-neuronal interactions are impaired in the schizophrenia model of repeated MK801 exposure. *Neuropsychopharmacology* 31: 1880-7, 2006.

67. Konradi C, Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther* 97: 153-79, 2003.
68. Kotecha SA, Oak JN, Jackson MF, Perez Y, Orser BA, Van Tol HH, MacDonald JF. A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron* 35: 1111-22, 2002.
69. Krebs MO, Desce JM, Kemel ML, Gauchy C, Godeheu G, Cheramy A, Glowinski J. Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J Neurochem* 56: 81-5, 1991.
70. Kwon JS, Shin YW, Kim CW, Kim YI, Youn T, Han MH, Chang KH, Kim JJ. Similarity and disparity of obsessive-compulsive disorder and schizophrenia in MR volumetric abnormalities of the hippocampus-amygdala complex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 962-4, 2003.
71. Laruelle M, Frankle WG, Narendran R, Kegeles LS, Abi-Dargham A. Mechanism of action of antipsychotic drugs: from dopamine D(2) receptor antagonism to glutamate NMDA facilitation. *Clin Ther* 27 Suppl A: S16-S24, 2005.
72. Law AJ, Deakin JF. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport* 12: 2971-4, 2001.
73. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 47-52, 2002.
74. Leveque JC, Macias W, Rajadhyaksha A, Carlson RR, Barczak A, Kang S, Li XM, Coyle JT, Haganir RL, Heckers S, Konradi C. Intracellular modulation of NMDA receptor function by antipsychotic drugs. *J Neurosci* 20: 4011-20, 2000.
75. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 337: 115-20, 1997.
76. Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr Res* 19: 1-17, 1996.
77. Mahadik SP, Mukherjee S, Correnti EE, Kelkar HS, Wakade CG, Costa RM, Scheffer R. Plasma membrane phospholipid and cholesterol distribution of skin fibroblasts from drug-naive patients at the onset of psychosis. *Schizophr Res* 13: 239-47, 1994.
78. Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18: 156-63, 1998.
79. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17: 2921-7, 1997.

80. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2: 1547-58, 1989.
81. Norwood WI, Ingwall JS, Norwood CR, Fossel ET. Developmental changes of creatine kinase metabolism in rat brain. *Am J Physiol* 244: C205-C210, 1983.
82. O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 414: 253-7, 1997.
83. Olbrich HM, Frizze J, Vauth R. Schizophrenie und andere psychotische Störungen. 1. ed. München; Wien; Baltimore: Urban & Schwarzenberg, p. 405-481, 1999.
84. Pall HS, Williams AC, Blake DR, Lunec J. Evidence of enhanced lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients taking phenothiazines. *Lancet* 2: 596-9, 1987.
85. Peet M, Laugharne J, Rangarajan N, Reynolds GP. Tardive dyskinesia, lipid peroxidation, and sustained amelioration with vitamin E treatment. *Int Clin Psychopharmacol* 8: 151-3, 1993.
86. Pietraszek M, Golembiowska K, Bijak M, Ossowska K, Wolfarth S. Differential effects of chronic haloperidol and clozapine administration on glutamatergic transmission in the fronto-parietal cortex in rats: microdialysis and electrophysiological studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366: 417-24, 2002.
87. Prass K, Royl G, Lindauer U, Freyer D, Megow D, Dirnagl U, Stockler-Ipsiroglu G, Wallimann T, Priller J. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 452-9, 2007.
88. Reddy R, Sahebarao MP, Mukherjee S, Murthy JN. Enzymes of the antioxidant defense system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 30: 409-12, 1991.
89. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65: 27-33, 1994.
90. Roberts GW, Royston MC, Weinberger DR. Schizophrenia. In: Graham DI, Lantos PL, eds. *Greenfield's neuropathology*. London: Edward Arnold, p. 897-929, 1997.
91. Rothman DL, Sibson NR, Hyder F, Shen J, Behar KL, Shulman RG. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1165-77, 1999.
92. Sakellaris G, Kotsiou M, Tamiolaki M, Kalostos G, Tsapaki E, Spanaki M, Spilioti M, Charissis G, Evangeliou A. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. *J Trauma* 61: 322-9, 2006.

93. Sanganahalli BG, Joshi PG, Joshi NB. NMDA and non-NMDA receptors stimulation causes differential oxidative stress in rat cortical slices. *Neurochem Int* 49: 475-80, 2006.
94. Sauter A, Rudin M. Determination of creatine kinase kinetic parameters in rat brain by NMR magnetization transfer. Correlation with brain function. *J Biol Chem* 268: 13166-71, 1993.
95. Selemon LD, Goldman-Rakic PS. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45: 17-25, 1999.
96. Shear DA, Haik KL, Dunbar GL. Creatine reduces 3-nitropropionic-acid-induced cognitive and motor abnormalities in rats. *Neuroreport* 11: 1833-7, 2000.
97. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9: 315-25, 1990.
98. Steullet P, Neijt HC, Cuenod M, Do KQ. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience* 137: 807-19, 2006.
99. Stockler S, Hanefeld F, Frahm J. Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *Lancet* 348: 789-90, 1996.
100. Stockler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von FK. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet* 58: 914-22, 1996.
101. Stotz-Ingenlath G. Epistemological aspects of Eugen Bleuler's conception of schizophrenia in 1911. *Med Health Care Philos* 3: 153-9, 2000.
102. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60: 1187-92, 2003.
103. Vaddadi KS, Courtney P, Gilleard CJ, Manku MS, Horrobin DF. A double-blind trial of essential fatty acid supplementation in patients with tardive dyskinesia. *Psychiatry Res* 27: 313-23, 1989.
104. van den Berg CJ, Garfinkel D. A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J* 123: 211-8, 1971.
105. Vicario-Abejon C. Long-term culture of hippocampal neurons. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3: Unit, 2004.
106. Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, Kraft T, Stolz M. Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism. *MAGMA* 6: 116-9, 1998.

107. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 (Pt 1): 21-40, 1992.
108. Weber JD, Hu W, Jefcoat SC, Jr., Raben DM, Baldassare JJ. Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27. *J Biol Chem* 272: 32966-71, 1997.
109. Weiss AP, Schacter DL, Goff DC, Rauch SL, Alpert NM, Fischman AJ, Heckers S. Impaired hippocampal recruitment during normal modulation of memory performance in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53: 48-55, 2003.
110. Wu G, Malinow R, Cline HT. Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science* 274: 972-6, 1996.
111. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80: 1107-213, 2000.
112. Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lin ZP, Nelson D, Pleasure D, Erecinska M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Dev Neurosci* 15: 343-50, 1993.
113. Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Kinetics and compartmentation of energy metabolism in intact skeletal muscle determined from ¹⁸O labeling of metabolite phosphoryls. *J Biol Chem* 266: 15110-9, 1991.
114. Zhang J, Graham DG, Montine TJ, Ho YS. Enhanced N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn-superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 53-61, 2000.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rujescu für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit, vor allem aber für seine freundschaftliche Unterstützung und wissenschaftliche Förderung. Er war ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mein Interesse an der Neurobiologie auch über diese Arbeit hinausgehend wecken konnte.

Herrn Dr. Just Genius möchte ich für seine langjährige und persönliche Betreuung danken. Mit viel Engagement arbeitete er mich in die überaus anspruchsvolle mikrochirurgische Technik der Rattenpräparation ein, unterstützte mich bei der Planung der Versuche und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Seine immerwährende Geduld und Zeit, die er mir trotz seiner ständigen klinischen und wissenschaftlichen Belastung entgegenbrachte, war für mich beispiellos.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft bedanken. Besonderer Dank geht dabei an Nadine Kastrup, Isabella Dietrich und Marion Boxleitner.

Danke an meine Eltern, die immer Interesse an meiner Arbeit zeigten und mich durch ihre stets positiven Worte moralisch sehr unterstützten.

Meinem Freund Martin Kiechle vielen Dank für seine Hilfe bei den Formatierungsarbeiten sowie für seine aufbauenden und ermunternden Worte, die mir immer wieder neue Energie gaben an der Arbeit weiterzuschreiben.

10. Lebenslauf

Johanna Sophia Geiger

Geboren am 30. Juni 1982 in München

Schule, Studium und Beruf

06/2009	Assistenzärztin, Medizinische Klinik II, Klinikum der Universität München - Großhadern
11/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung nach neuer ÄAppO Abschluss des Studiums der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität München Gesamtnote „gut“
09/2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung nach alter ÄAppO
08/2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2001	Studium der französischen Sprache an der Universität Paul Valéry, Montpellier III, Frankreich <i>Certificat pratique de la Langue Française</i>
06/2001	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8), Latinum und Graecum
09/1992	Wittelsbacher Gymnasium München
09/1988	Grundschule Dachau-Süd

Praktisches Jahr

Innere Medizin	Medizinische Klinik und Poliklinik II und III Klinikum der Universität München - Großhadern
Dermatologie	Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie LMU München
Chirurgie	Nelson R Mandela School of Medicine University of Kwazulu Natal Durban, Südafrika

Famulaturen

Tropenmedizin	Medizinische DirektHilfe in Afrika e.V. Tawfiq Hospital in Malindi, Kenia (2007)
Kardiologie	Deutsches Herzzentrum Berlin (2006)
Allgemeinmedizin	Praxis Dr. H. Kiechle, Kimratshofen (2005)
Viszeralchirurgie	Klinikum Großhadern, LMU München (2005)